

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ksenija D. Veličković

**TRANSKRIPCIONA REGULACIJA RAZVOJA I
HIPERPLAZIJE MRKOG MASNOSTI**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ksenija D. Veličković

**TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF BROWN
ADIPOSE TISSUE HIPERPLASIA AND
DEVELOPMENT**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

**KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE
DISERTACIJE**

MENTORI:

dr Aleksandra Korać, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Aleksandra Čvoro, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,
Univerzitet u Beogradu
istraživač, The Methodist Hospital Research Institute
Department of Genomic Medicine, Houston, Texas, USA

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Bato Korać, vanredni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu
naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,
Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Srdić, docent
Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija urađena je u okviru projekta #173055 - „Belo i/ili mrko: značaj masnog tkiva u održavanju ukupne redoks zavisne metaboličke kontrole u fiziološkim adaptacijama i metaboličkim poremećajima“, koji je financiran od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, na Katedri za biologiju ćelija i tkiva, pri Centru za elektronsku mikroskopiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i u laboratoriji Odeljenja za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković“ u Beogradu.

Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Prof. dr Aleksandri Korać, mentoru, koja me je nesebično uvela u svet ćelijske biologije, na ukazanom poverenju, prenetom znanju i iskustvima tokom mog istraživačkog rada, kao i sugestijama tokom uobličavanja ove disertacije;

Dr Aleksandri Čvoro, za svu pomoć i savete, kako u istraživačkom radu, tako i pri pisanju doktorske disertacije;

Prof. dr Batu Koraću, na sugestijama koje su mi pomogle da rešim nedoumice koje su se javljale tokom istraživanja;

Dr Biljani Srdić, za stručnu podršku prilikom izrade ove disertacije;

Dr Biljani Buzadžić, za svu pomoć i savete u istraživačkom radu;

Prof. dr Vesni Koko, za prve korake koji su mi otvorili vrata nauke.

Tokom izrade disertacije imala sam podršku i pomoć mojih dragih koleginica/kolege, sa kojima sam ovih godina delila dobro i zlo. Zato se zahvaljujem:

Dr Milici Markelić, na nesebičnoj drugarskoj pomoći i oštrom oku kojem ništa ne može da promakne;

Hvala Vesni, Ani, Aleksandri, Igoru i Milici Vučetić za svu pomoć od prvih dana mog laboratorijskog rada pa do danas; kao i za pomoć pri pisanju disertacije;

Biolozima Centra za elektronsku mikroskopiju, Aniti Lazarević i Maji Bogdanović, za pomoć u pripremi i izradi elektron-mikrografija.

Hvala mojoj porodici na svemu što smo zajedno prošli. Velji i Leni na ljubavi i strpljenju - hvala što postojite.

TRANSKRIPCIONA REGULACIJA RAZVOJA I HIPERPLAZIJE MRKOG MASNOG TKIVA

REZIME

Mrko masno tkivo (*engl.* brown adipose tissue, BAT) je specijalizovano za produkciju toplote zahvaljujući prisustvu dekuplujućeg proteina (*engl.* uncoupling protein 1, UCP1) koji se nalazi u unutrašnjoj membrani mitohondrija. Kada je stimulisano, BAT se transformiše iz neaktivnog, dormantnog oblika u hiperplastični, termogeno aktivni organ. Izlaganje hladnoći dovodi do biohemijskih, morfoloških i citoloških promena u tkivu. Povećava se ekspresija UCP1, sinteza proteina i DNK, kao i proces biogeneze mitohondrija i peroksizoma. Pored toga, indukcija termogeneze dovodi do povećanja mase BAT, pre svega na račun njegove hiperplazije. Proces adipogeneze, usko povezan sa procesom angiogeneze se odvija kroz nekoliko stupnjeva i podrazumeva proliferaciju i diferencijaciju prekursorskih ćelija prisutnih u BAT. Sve navedene promene su pod kontrolom mreže transkripcionih faktora koji koordinišu ekspresiju brojnih proteina odgovornih za stvaranje krajnjeg fenotipa mrkih adipocita. Iako su do sada identifikovani brojni transkripcioni faktori uključeni u proces hiperplastičnog odgovora, nema dovoljno podataka o njihovoj ekspresiji tokom ranih faza izlaganja hladnoći. Cilj ovog istraživanja je bio da utvrdi molekulske mehanizme koji se nalaze u osnovi procesa aktivacije BAT, transkripcione faktore i proteine uključene u rane faze proliferacije i diferencijacije BAT kod pacova izlaganih hladnoći kao i tokom u razvoja humanog BAT u fetalnom periodu. U tu svrhu, pacovi soja Mill Hill su podeljeni u sedam eksperimentalnih grupa, od kojih je jedna bila kontrolna dok je preostalih šest izlagano hladnoći ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) u periodu od 3, 6, 12, 24, 48 i 72 sata. Interskapularni depo BAT pacova je izolovan i pripremljen za RT-PCR i Western blot analizu, svetlosnu i elektronsku mikroskopiju. Za ispitivanje ekspresije transkripcionih faktora i

proteina uključenih u razvoj BAT čoveka korišćeni su uzorci humanih fetusa starosti XV-XXIII nedelje, pripremljeni za Western blot analizu, svetlosnu i elektronsku mikroskopiju. Rezultati su pokazali da se u osnovi povećanja mase tkiva najvećim delom nalazi hiperplazija prekursorskih i endotelskih ćelija i da je ovaj proces pod strogom kontrolom transkripcionih faktora. Šta više, pokazana je stogo koordinisana ekspresija ključnih regulatora termogenog odgovora UCP1, PPAR γ (*engl.* peroxisome proliferator-activated receptor γ) i PGC-1 α (*engl.* PPAR γ -coactivator 1 α) u BAT pacova i humanih fetusa. Pored toga, uočena je sinhronizacija genske i proteinske ekspresije regulatornih proteina procesa adipo- i angiogeneze, što je praćeno odgovarajućim strukturnim promenama tkiva. Sve napred navedene promene praćene su ultrastrukturnim promenama vanćelijskog matriksa u cilju omogućavanja rasta tkiva.

KLJUČNE REČI: mrko masno tkivo, hiperplazija, hladnoća, transkripcioni faktori, adipogeneza, angiogeneza

NAUČNA OBLAST: BIOLOGIJA

UŽA NAUČNA OBLAST: BIOLOGIJA ĆELIJA I TKIVA

UDK BROJ: 57.052:[591.134:591.82](043.3)

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF BROWN ADIPOSE TISSUE HIPERPLASIA AND DEVELOPMENT

Abstract

Brown adipose tissue (BAT) is highly specialized mammalian organ and is more abundant in hibernating, cold-acclimated and newborn mammals, where it plays key role in thermogenesis. The BAT function is related to uncoupling protein 1 (UCP1), located in the inner mitochondrial membrane. Cold exposure activates sympathetic nervous system which triggers BAT thermogenic program. This complex process on biochemical, morphological and cell levels includes: increased UCP1 expression, precursor cells proliferation and differentiation, mitochondrial and peroxisomal biogenesis, and angiogenesis. Those events rapidly transform „dormant“ tissue into a hyperplastic, active adipose organ. All changes are controlled by numerous transcription factors which coordinate expression of many proteins responsible for acquiring of mature brown adipocyte phenotype. The aims of this study were to determine the molecular mechanisms that underlie the process of BAT activation, transcription factors and proteins involved in the early stages of proliferation and differentiation in rats exposed to cold, as well during BAT development. Mill Hill rats were exposed to cold (4 ± 1 °C) for 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours. Interscapular BAT was isolated and prepared for qRT-PCR, Western blot analysis, light and transmission electron microscopy. To study the expression of transcription factors and proteins involved in BAT development, tissue samples from human fetuses XV-XXIII weeks old were prepared for Western blot analysis, light and transmission electron microscopy. The result showed that BAT hyperplastic response is based on the proliferation of brown adipocyte precursors and endothelial cells, and that this process is under tight control of many transcription factors. Moreover, this process is strongly coordinated by

expression of key regulators of BAT thermogenic response: UCP1, PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ) and PGC-1 α (PPAR γ coactivator-1 α) in both rats and human BAT. In addition, there is evident synchronization of gene and protein expression involved in adipogenesis and angiogenesis with ultrastructural changes observed in the tissue. All of the above changes were followed by structural changes of extracellular matrix, to ensure proper tissue growth and expansion. Taken together, the results show that BAT amazing plasticity which enables rapid tissue thermogenic response is strongly controlled by transcription factors network in both, cold-induced BAT hyperplasia and fetal BAT development.

KEY WORDS: brown adipose tissue, hyperplasia, cold, transcription factors, adipogenesis, angiogenesis

SCIENTIFIC FIELD: BIOLOGY

SPECIAL TOPICS: CELL AND TISSUE BIOLOGY

UDC NUMBER: 57.052:[591.134:591.82](043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. STRUKTURA I FUNKCIJA MRKOG MASNOM TKIVA	1
1.2. TRANSKRIPCIONA REGULACIJA ADIPOGENEZE	7
1.3. OSTALI FAKTORI UKLJUČENI U ADIPOGENEZU	12
1.4. POREKLO MRKIH ADIPOCITA	13
1.5. MRKO MASNO TKIVO ČOVEKA	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	17
3. MATERIJAL I METODI	18
3.1. PLAN EKSPERIMENTA	18
3.1.1. Model hiperplazije BAT pacova indukovane hladnoćom	18
3.1.2. Hiperplazija BAT čoveka tokom fetalnog razvoja	19
3.2. RT-PCR ANALIZA TKIVA	19
3.2.1. Priprema tkiva za RT-PCR	19
3.2.2. RT-PCR u realnom vremenu	20
3.2.3. Statistička obrada rezultata dobijenih RT-PCR analizom	21
3.3. WESTERN BLOT ANALIZA TKIVA	22
3.3.1. Priprema tkiva za Western blot	22
3.3.2. Određivanje koncentracije proteina	23
3.3.3. Elektroforeza proteina	23
3.3.4. Western blot	24
3.3.5. Detekcija proteina nakon Western blota	24
3.3.6. Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom i statistička obrada rezultata	25
3.4. ANALIZA TKIVA NA NIVOU SVETLOSNE MIKROSKOPIJE	26
3.4.1. Priprema tkiva za svetlosnu mikroskopiju	26
3.4.2. Imunohistohemijska tehnika detektovanja proteina streptavidin-biotin metodom	26
3.4.3. Imunohistohemijska tehnika detektovanja i kolokalizacije proteina fluorescentno-obeležanim antitelima	27
3.4.3.1. Kvantifikacija i statistička obrada rezultata kolokalizacije proteina	28
3.5. ANALIZA TKIVA NA NIVOU TRANSMISIONE ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE (TEM)	28
3.5.1. Priprema tkiva za TEM	28
3.5.2. Imunocitohemijska metoda detekcije proteina (imunogold metoda) na nivou TEM	29
4. REZULTATI	30
4.1. ANIMALNI MODEL IZLAGANJA HLADNOĆI	30
4.1.1. Efekat izlaganja hladnoći na termogeni kapacitet BAT i mitohondriogenezu	30
4.1.1.1. Ekspresija UCP1 u BAT	30
4.1.1.1.1. Količina UCP1 iRNK	30
4.1.1.1.2. Količina UCP1 proteina	30
4.1.1.1.3. Imunohistohemijska detekcija UCP1	31

4.1.1.2. Imunohistohemijaska detekcija noradrenalina	32
4.1.1.3. Ekspresija PPARγ u BAT	36
4.1.1.3.1. Količina PPAR γ iRNK	36
4.1.1.3.2. Količina PPAR γ proteina	36
4.1.1.4. Ekspresija PGC-1α u BAT	36
4.1.1.4.1. Količina PGC-1 α iRNK	36
4.1.1.4.2. Količina PGC-1 α proteina	38
4.1.1.5. Ultrastruktorna analiza mitohondriogeneze u mrkim adipocitima	38
4.1.1.6. Količina mtDNK	41
4.1.1.7. Količina Drp1 proteina	41
4.1.1.8. Količina Mfn2 proteina	41
4.1.1.9. Količina NRF1 proteina	43
4.1.2. Efekat izlaganja hladnoći na proliferaciju i diferencijaciju ćelija adipogenog pula	43
4.1.2.1. Ekspresija CEBP/α	43
4.1.2.1.1. Količina CEBP/ α iRNK	43
4.1.2.2. Ekspresija PPARδ	44
4.1.2.2.1. Količina PPAR δ iRNK	44
4.1.2.3. Ekspresija PCNA	45
4.1.2.3.1. Količina PCNA proteina	45
4.1.2.3.2. Imunohistohemijaska detekcija PCNA	45
4.1.2.4. Ekspresija Ki-67	46
4.1.2.4.1. Imunohistohemijaska detekcija Ki-67	46
4.1.2.5. Ekspresija FABP4	49
4.1.2.5.1. Količina Fabp4 iRNK	49
4.1.2.6. Ekspresija Myf5	49
4.1.2.6.1. Količina Myf5 iRNK	49
4.1.2.7. Ekspresija BMP7	49
4.1.2.7.1. Količina BMP7 iRNK	49
4.1.2.7.2. Količina BMP7 proteina	51
4.1.2.7.3. Imunohistohemijaska detekcija BMP7	51
4.1.2.8. Ekspresija BMP4	53
4.1.2.8.1. Količina BMP4 iRNK	53
4.1.2.9. Ekspresija KLF9	53
4.1.2.9.1. Količina KLF9 iRNK	53
4.1.2.10. Ekspresija KLF15	54
4.1.2.10.1. Količina KLF15 iRNK	54
4.1.2.11. Ultrastruktorna analiza proliferacije i diferencijacije mrkih adipocita	55
4.1.3. Efekat izlaganja hladnoći na angiogenezu BAT	60
4.1.3.1. Ekspresija VEGF	60
4.1.3.1.1. Količina VEGF iRNK	60
4.1.2.7.2. Količina VEGF proteina	61
4.1.2.7.3. Imunohistohemijaska detekcija VEGF	61
4.1.3.2. Ekspresija endoglina	63

4.1.3.2.1. Količina iRNK za endoglin	63
4.1.3.3. Ultrastrukturalna analiza angiogeneze u BAT	63
4.2. RAZVOJ HUMANOG FETALNOG BAT	66
4.2.1. Ultrastrukturalna analiza humanog fBAT	66
4.2.2. Termogeni kapacitet humanog fBAT	69
4.2.2.1. Imunohistohemijska detekcija UCP1	69
4.2.2.2. Količina proteina UCP1	69
4.2.2.3. Imunohistohemijska detekcija noradrenalina	70
4.2.3. Regulatori diferencijacije i mitohondriogeneze humanog fBAT	71
4.2.3.1. Količina proteina PPARγ	71
4.2.3.2. Količina proteina PGC-1α	71
4.2.4. Regulatori strukturnog i funkcijskog razvoja humanog fBAT	72
4.2.4.1. Estrogenski receptori	72
4.2.4.1.1. Količina proteina ER α i ER β	72
4.2.4.1.2. Imunohistohemijska detekcija ER α i ER β	72
4.2.4.1.3. Imunocitohemijska detekcija ER α i ER β	73
4.2.4.1.4. Kolokalizacija ER α i ER β	75
4.2.4.1.5. Kolokalizacija ER i PPAR γ	75
4.2.4.1.6. Kolokalizacija ER i PGC-1 α	75
4.2.4.2. Imunohistohemijska detekcija BMP7	77
5. DISKUSIJA	78
5.1. TERMOGENI ODGOVOR BAT PRILIKOM IZLAGANJA HLADNOĆI	78
5.2. INDUKCIJA PROLIFERACIJE I DIFERENCIJACIJE ĆELIJA ADIPOGENOG PULA	82
5.3. INDUKCIJA ANGIOGENEZE U BAT	87
5.4. HUMANO FETALNO BAT	90
5.4.1. Uloga ER u razvoju humanog fBAT	90
5.4.2. Termogeni kapacitet humanog fBAT	92
6. ZAKLJUČCI	95
7. LITERATURA	97
PRILOG – SPISAK SKRAĆENICA	I
BIOGRAFIJA AUTORA	II

1. UVOD

1.1. STRUKTURA I FUNKCIJA MRKOG MASNOG TKIVA

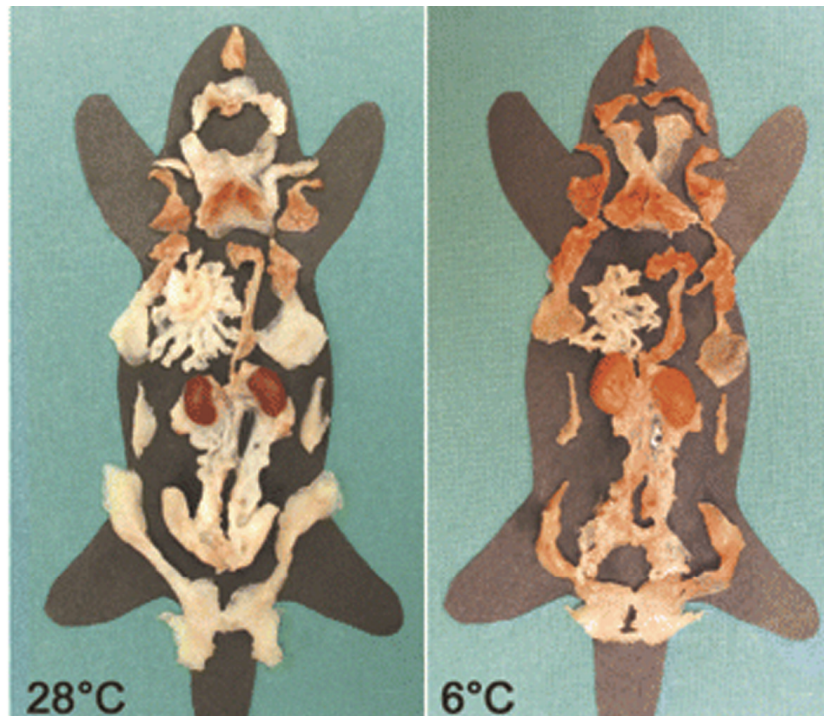
Mrkom masnom tkivu (*engl.* brown adipose tissue, BAT) od kada je prvi put opisano (Gessner, 1551) pripisivane su različite uloge: smatran je delom timusa, endokrinim organom i organom koji učestvuje u formiranju krvi. Na osnovu njegove mikroskopske strukture, BAT je okarakterisan kao modifikovana vrsta belog masnog tkiva (*engl.* white adipose tissue, WAT) ili endokrini organ (Johanson, 1959; Smith i Horwitz, 1969; Afzelius, 1970). Različite fiziološke uloge koje su pripisivane BAT tokom godina razlog su što je smatrano hibernirajućom, interskapularnom, lipidnom žlezdom, i čak primitivnim masnim tkivom (Rial i Gonzales-Barroso, 2001).

Sredinom dvadesetog veka jasno je pokazana sposobnost BAT da aktivno produkuje toplotu (Smith i Hock, 1963) i time ustanovljena njegova primarna funkcija u održavanju telesne temperature, a takva produkcija toplote nazvana je termogeneza bez drhtanja. Nešto kasnije, pokazano je da BAT može proizvoditi toplotu nakon unosa određenih vrsta i količina hrane i tako učestvovati u održanju telesne mase (Stock, 1989).

Noviji podaci su objedinili sve karakteristike BAT kroz istoriju proučavanja i okarakterisali ga zajedno sa WAT (**Slika 1**) kao jedinstveni adipozni organ (Cinti, 2001). Ovakav naziv je na neki način opravdan imajući u vidu da BAT ne samo da ima sposobnost da deponuje lipide, već je izuzetno prokrvljen, ima ulogu endokrinog organa, i histološki posmatrano, jednim delom jeste modifikovano WAT što se jasno vidi kroz proces transdiferencijacije adipocita (Lončar, 1991; Cinti, 2005).

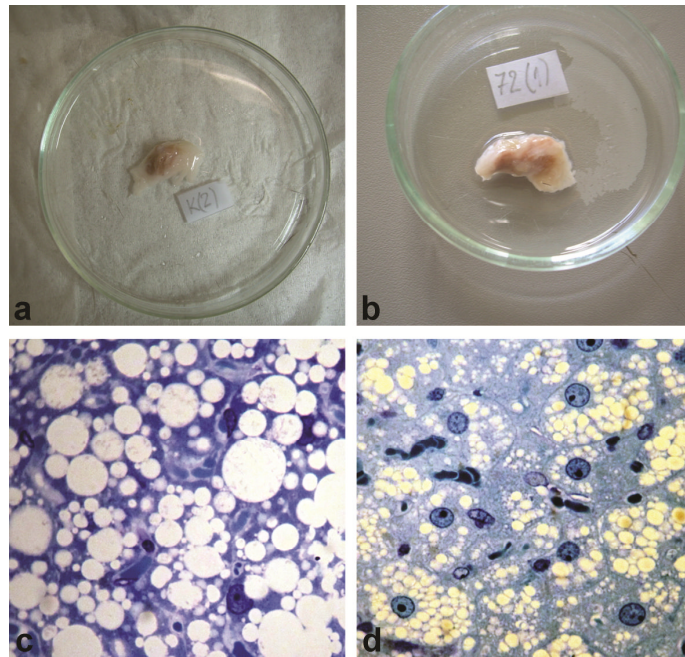
BAT je prisutan kod hibernatora, malih sisara izlaganih hladnoći i ljudi u ranom postnatalnom periodu. Kod malih životinja, uključujući

pacove, BAT opstaje tokom čitavog života dok kod čoveka, najveći deo BAT podleže ultrastrukturnim i molekulskim promenama, akumulira lipide i transformiše se u WAT.

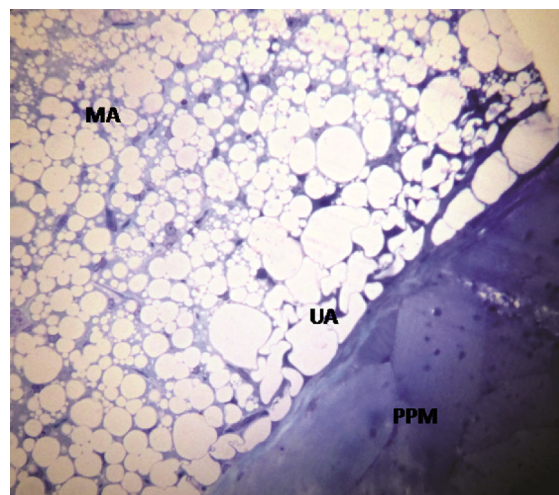


Slika 1. Lokalizacija WAT i BAT kod pacova. Izlaganje hladnoći dovodi do promene mase i obojenosti adipoznog organa na račun povećanja mitohondrija i velike prokrvljenosti BAT. Modifikovano iz: *Cinti, 2009. Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297: 977-86.

BAT se odlikuje dinamičnom strukturom i izuzetnom plastičnošću, što se najbolje vidi kada se tkivo stimuliše hladnoćom. Naime, pri izlaganju hladnoći dolazi do povećanja mase BAT i stimulacije njegove termogene funkcije. U našim prethodnim radovima (Buzadžić i sar., 1999; Petrović i sar., 2005a) ali i radovima drugih autora (Bukowiecki i sar., 1986) pokazano je da izlaganje hladnoći tokom 72 sata povećava masu tkiva 30-40 procenata (**Slika 2**).



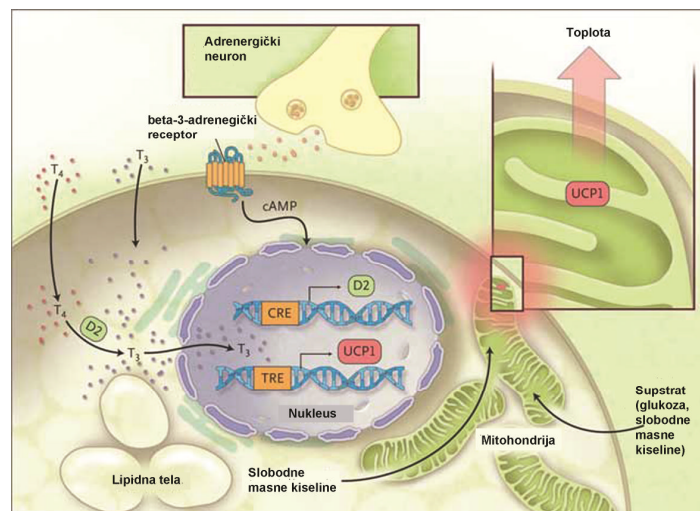
Slika 2. Hiperplazija BAT indukovana hladnoćom. BAT se odlikuje izuzetnom plastičnošću koja se ogleda u brznoj i intenzivnoj indukciji prekursorskih ćelija tokom izlaganja hladnoći. Tokom 72 sata masa BAT se poveća za oko 40%, najvećim delom na račun proliferacije i diferencijacije ćelija tkiva. Na nivou svetlosne mikroskopije najizraženije promene su zapažene na nivou lipidnih tela, koja se usitnjavaju, i kapilarne mreže koja se uvećava vazodilatacijom i angiogenezom. BAT kontrolne grupe i grupe izlagane hladnoći 72 sata odmah po izolaciji (**a,b**), odnosno na nivou svetlosne mikroskopije (**c,d**). Orig. uveličanje: 40x.



Slika 3. Presek BAT pacova na nivou svetlosne mikroskopije (SM). BAT pacova čine najvećim delom (oko 90%) mrki adipociti (**MA**) i endotelske ćelije. Ostatak tkiva čine prekursorske ćelije i prateće ćelije vezivno-tkivne strome. Na periferiji lobusa uočava se venac unilokulusnih adipocita (**UA**) i poprečno-prugasta muskulatura (**PPM**) koja okružuje BAT. Orig. uveličanje: 20x.

BAT je izgrađen (**Slika 3**) najvećim delom od mrkih adipocita (40%), endotelskih ćelija (50%), preadipocita (2%) i intersticijskih ćelija (1.7%), dok ostatak čine makrofage, mastociti, fibroblasti, Švanove ćelije i ćelije poreklom iz krvotoka (Bukowiecki i sar., 1986).

Sa citološkog aspekta BAT se jasno razlikuje od WAT po boji, po čemu je i dobilo naziv, što je posledica guste kapilarne mreže i brojnih mitohondrija u mrkim adipocitima. Mitohondrije BAT se odlikuju brojnim invaginacijama unutrašnje membrane – kristama, u koje se ugrađuje dekupljujući protein (*engl.* uncoupling protein 1, UCP1) specifičan za ove ćelije. Zahvaljujući prisustvu UCP1 omogućeno je vraćanje protona iz međumembranskog prostora u matriks mitohondrija, čime se energija nastala pri oksidaciji supstrata ne iskorišćava za sintezu ATP već rasipa u vidu toplote (**Slika 4**). Postojanje bogate vaskularne mreže omogućava brzo dopremanje supstrata i kiseonika do tkiva, kao i transfer produkovane toplote u sve regione organizma. Pored guste kapilarne mreže, tkivo poseduje bogatu simpatičku inervaciju koja posreduje u centralnoj kontroli termogenog procesa (Klingenspor, 2003).



Slika 4. Aktivacija mrkog masnog tkiva. Izlaganje hladnoći dovodi do pojačanog oslobađanja noradrenalina koji se vezuje za β_3 -adrenergičke receptore i povećanja cAMP. Ovo za posledicu ima aktivaciju hormon-senzitivne lipaze i oslobađanje masnih kiselina koje se koriste u procesu β -oksidacije i aktivacije UCP1. Modifikovano iz: *Celi, 2009. N Engl J Med.* 360: 1553-56.

Termogeneza BAT je pod kontrolom simpatičkog nervnog sistema (SNS) i izlaganje hladnoći dovodi do transformacije neaktivnog tkiva (sa proliferativnog i termogenog aspekta) u hiperplastični, termogeno aktivni organ.

Izlaganje hladnoći dovodi do pojačanog oslobađanja noradrenalina koji vezivanjem za α - i β -adrenergičke receptorne izoforme (α -AR i β -AR) povećava nivo cAMP. Ovaj sekundarni glasnik dovodi do oslobađanja katalitičke subjedinice protein kinaze A koja, sa druge strane, fosforiliše brojne proteine uključujući hormon-senzitivnu lipazu, ključni enzim lipolize. Oslobođene masne kiseline aktiviraju UCP1 i koriste se u procesu mitohondrijalne β -oksidacije (Klingenspor, 2003). Hiperplazija BAT je stimulisana β_1 -AR (Himms-Hagen i sar., 1994; Klaus i sar., 2001), dok je lipolitička i termogena funkcija posredovana najvećim delom preko β_3 -AR (Zhao i sar., 1998).

Uporedo sa aktivacijom lipolize, izlaganje hladnoći dovodi do proliferacije mrkih adipocita, mitohondriogeneze, povećanja ekspresije i aktivacije UCP1, biogeneze peroksizoma, kao i povećanja sinteze proteina, RNK i DNK (Himms-Hagen, 1990; Otašević i sar., 2011). Ovi procesi dovode do povećanja mase tkiva pre svega putem hiperplazije tkiva (Suter, 1969; Bukowiecki i sar., 1986), odnosno proliferacije intersticijskih ćelija, preadipocita i endotelskih ćelija ali i diferencijacije preadipocita koje karakteriše indukcija UCP1 ekspresije, biogeneza mitohondrija i nagomilavanje lipida (Klaus, 1997; Korać i sar., 2008; Petrović i sar., 2010).

Procesi konverzije unilokulusnih mrkih adipocita, koji u citoplazmi poseduju jedno veliko lipidno telo u multilokulusni adipocit, sa većim brojem sitnijih lipidnih tela i razvoj kapilara (angiogeneza) takođe su sastavni i neodvojivi deo aktivacije BAT (Cinti, 2001; Otašević i sar., 2011).

Svi navedeni procesi su na molekulskom nivou regulisani brojnim faktorima, među kojima ključnu ulogu imaju: UCP1, PPAR γ (*engl.*

peroxisome proliferator-activated receptor γ) i PGC-1 α (*engl.* PPAR γ coactivator-1 α) (Puigserver i sar., 1998; Klingenspor, 2003).

U zavisnosti od trajanja stimulusa, aktivnost i ekspresija UCP1 su specifično regulisane. Akutno izlaganje hladnoći se karakteriše porastom biohemijske aktivnosti UCP1 proteina, dok je hronično izlaganje hladnoći regulisano na nivou genske ekspresije i direktno je povezano sa biogenezom mitohondrija (Puigserver i sar., 1992). Kao što je istaknuto, masne kiseline oslobođene u procesu lipolize smatraju se važnim regulatorom aktivnosti i funkcije UCP1, dok je genska ekspresija UCP1 pod noradrenergičkom kontrolom.

Pored toga, pokazano je da ekspresiju UCP1 reguliše nekoliko transkripcionih faktora, uključujući receptor za retinoičnu kiselinu, tireoidne hormone i PPAR familiju (PPAR α , PPAR δ , PPAR γ) nukleusnih receptora (Silva i Rabelo, 1997).

PPAR γ je visoko eksprimiran u BAT i pozitivno reguliše ekspresiju gena uključenih u proces proliferacije i diferencijacije BAT (Nedergaard i sar., 2005). On to čini u kooperaciji sa PGC-1 α koji kao koaktivator povećava verovatnoću vezivanja PPAR γ za regulatorne sekvence ciljnih gena (Puigserver i sar., 1998).

PGC-1 α je definisan u BAT kao hladnoćom-indukovani transkripcioni koaktivator neophodan za ekspresiju gena uključenih u mitohondriogenezu i oksidativni metabolizam (Puigserver i sar., 1998). Kao koaktivator brojnih transkripcionih faktora u procesu adipogeneze, smatra se ključnim regulatorom adaptivne termogeneze, ali ne i glavnim regulatorom sazrevanja mrkih adipocita. Pokazano je da u odsustvu PGC-1 α i PGC-1 β preadipociti u kulturi zadobijaju karakteristike zrelih adipocita, ali gube sposobnost mitohondriogeneze (Uldry i sar., 2006) što bi moglo biti od velike važnosti za proces regulacije uspostavljanja termogenog fenotipa mrkih adipocita.

1.2. TRANSKRIPCIONA REGULACIJA ADIPOGENEZE

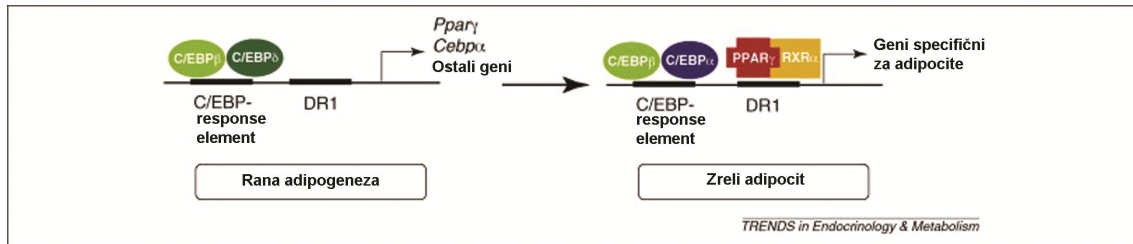
Na osnovu brojnih *in vitro* studija pokazano je da tokom procesa adipogeneze ćelije slične fibroblastima prolaze kroz određene morfološke promene i diferenciraju se u zrele adipocite u roku od 4-6 dana kada se izlože odgovarajućoj hormonskoj stimulaciji (Green i Kehinde, 1975; Chapman i sar., 1984; Entenmann i Hauner, 1996).

Tabela 1. Karakteristike različitih stupnjeva adipogeneze. Modifikovano iz: *Leterova i Lazar, 2009. Trends Endocrinol Metab. 20: 107-14.*

Stupanj adipogeneze	Karakteristike
Mezenhimski prekursor	Proliferacija Sposobnost diferencijacije ka mnogim linijama
„Opređeljeni“ preadipocit	Proliferacija Usmeravanje diferencijacije ka adipocitnoj liniji Morfološki nalik fibroblastu
Preadipocit zaustavljen u razvoju	Nemogućnost proliferacije usled kontaktne inhibicije
Mitotska klonska ekspanzija	Ponovni ulazak u ćelijski ciklus indukovano hormonskom stimulacijom Više ciklusa ćelijske deobe Indukcija C/EBP β i C/EBP δ ekspresije i aktivnosti
Terminalna diferencijacija	Zastoj ćelijskog ciklusa Indukcija PPAR γ i C/EBP δ ekspresije Transkripciona aktivnost adipocitnih gena (geni za metabolizam lipida i ugljenih hidrata, adipokini)
Zreli adipocit	Visoka ekspresija adipocitnih gena Transkripciona aktivnost PPAR γ , C/EBP δ i C/EBP β Morfološki, krupna lipidna tela zauzimaju veći deo ćelijske zapremine

Diferencijacija adipocita od prekursorskih ćelija je složen proces, odigrava se kroz nekoliko stupnjeva (**Tabela 1**) i uključuje kompleksnu i visoko orkestriranu mrežu transkripcionih faktora. Istraživanja u ovom smeru su dodatno otežana činjenicom da se gotovo svakodnevno pronalaze i opisuju novi faktori, sinergističkog i/ili antagonističkog delovanja.

Najznačajniji i najviše ispitivani transkripcioni faktori u procesu adipogeneze su PPAR γ i C/EBP α (*engl.* CCAAT/enhancer-binding protein α). Indukcija ova dva faktora karakteristična je za period terminalne diferencijacije i dovodi do obrazovanja krajnjeg fenotipa mrkih adipocita (Shao i Lazar, 1997).



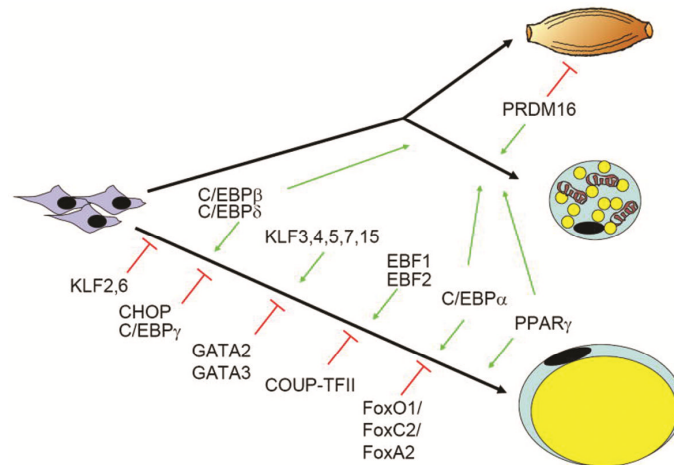
Slika 5. Model transkripcionog delovanja PPAR γ i C/EBP α tokom adipogeneze. Modifikovano iz: Lefterova i Lazar, 2009. *Trends Endocrinol Metab.* 20: 107-14.

C/EBP α pripada porodici visoko konzerviranih proteina i o njegovom značaju u procesu adipogeneze *in vivo* govori činjenica da delecija ovog gena kod miševa rezultuje nemogućnošću miševa da deponuju lipide (Wang i sar., 1995). Pored C/EBP α , identifikovana su još četiri člana ove porodice: pro-adipogeni faktori - C/EBP β i C/EBP δ , i anti-apoptogeni faktori - C/EBP γ i CHOP (CEBP homologni protein). C/EBP β i C/EBP δ su indukovani tokom ranih faza diferencijacije i zajedno indukuju ekspresiju C/EBP α i PPAR γ (Farmer, 2006).

Iako je važnost C/EBP α potvrđena, precizna uloga u adipogenezi nije jasna, delom zbog sinergističkog odnosa sa PPAR γ . Pored toga što međusobno regulišu ekspresiju (Rosen i sar., 2002), C/EBP α i PPAR γ pokazuju veliko preklapanje tokom vezivanja u regulatornim delovima ciljnih gena koji su često blizu jedan drugog (**Slika 5**) (Lefterova i Lazar, 2009).

Pored ova dva glavna regulatora adipogeneze, u proces proliferacije i diferencijacije mrkih adipocita uključena je čitava mreža aktivatora, ko-aktivatora, represora i ko-represora, koji sa druge strane koordinišu ekspresiju proteina važnih za uspostavljanje krajnjeg fenotipa mrkih adipocita. Poslednjih godina posebna pažnja se pridaje članovima grupe KLF transkripcionih faktora (**Slika 6**) (*engl.* Krüppel-like factor) koji se vezuju za CACCC/GC/GT – mesta u regulatornim delovima ciljnih gena, kontrolišući važne biološke procese kao što su proliferacija, diferencijacija, hematopoeza i progresija ćelijskog ciklusa (Bray i sar., 2009). Do sada je opisano 17 članova KLF porodice, od

kojih se osam smatra ključnim komponentama transkripcione mreže koja je odgovorna za kontrolu adipogeneze (Banerjee i sar., 2003; Oishi i sar., 2005).



Slika 6. Uloga pojedinih članova KLF transkripcionih faktora u determinaciji diferencijacije prekursorskih ćelija BAT. Zelenim linijama označeni su aktivatori, a crvenim linijama inhibitori razvića belih, mrkih adipocita i poprečno-prugastih mišićnih ćelija. KLF15 je prvi otkriveni član za koji je pokazano da ima udela u adipogenezi. Modifikovano iz: Rosen i sar., 2009. *Expert Opin Ther Targets*. 13: 975-86.

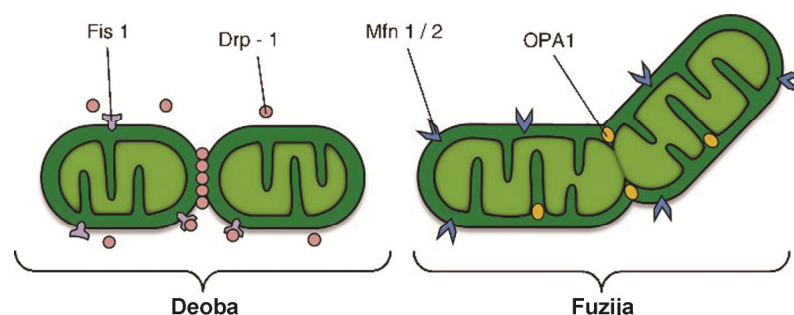
Prvi član KLF porodice za koji je pokazano da učestvuje u procesu adipogeneze jeste KLF15. Blokiranje ekspresije ovog faktora smanjuje ekspresiju PPAR γ , ključnog regulatora diferencijacije mrkih adipocita (Mori i sar., 2004). Uloga drugih članova je manje istražena, ali se zna da su neki od njih negativni regulatori adipogeneze (KLF2, KLF3, KLF7, KLF11), dok ostali do sada ispitani faktori predstavljaju pozitivne regulatore, koji deluju bilo direktno regulacijom ekspresije gena odgovornih za proliferaciju i diferencijaciju adipocita ili indirektno, putem regulacije unosa insulina u BAT (Bray i sar., 2009).

Pored transkripcionih faktora uključenih u proliferaciju i diferencijaciju, centralna uloga pripada faktorima koji regulišu proces mitohondriogeneze u BAT. Mitohondrije BAT se odlikuju neverovatnom plastičnošću koja se ogleda u brzim promenama veličine, broja, mase, oblika i ultrastrukture (Nisoli i sar., 2004; Petrović i sar., 2008). Ovi procesi uključuju ekspresiju preko 1000 gena i oko 20% proteina ćelije,

za šta je neophodna strogo koordinisana ekspresija gena nukleusnog i mitohondrijalnog genoma (mtDNK). Ključne komponente elektron-transportnog lanca u mitohondrijama kodirane su od strane mtDNK, dok je replikacija mitohondrija kodirana nukleusnim genima, čiji se produkti iz citoplazme transportuju u mitohondrije.

Glavni faktori transkripcije mtDNK su nukleusni respiratorni faktori 1 i 2 (*engl.* nuclear respiratory factor, NRF). NRF-1 kontroliše transkripciju gena koji kodiraju komponente elektron-transportnog lanca formirajući homodimere (Chan i sar., 1993; Villena i sar., 2002) kao i proteine koji regulišu replikaciju i transkripciju mtDNK (Klingenspor i sar., 1996; Liang i Ward, 2006).

Regulacija mitohondrijalne biogeneze u mrkim adipocitima je pod centralnom kontrolom PGC-1 α , što je potvrđeno brojnim *in vivo* i *in vitro* studijama (Uldry i sar., 2006; Lai i sar., 2008; Otašević i sar., 2011). Dinamične promene koje se dešavaju tokom biogeneze mitohondrija u BAT uključuju i druge proteine, među kojima najznačajniju ulogu imaju mitofuzini 1 i 2 (Mfn), GTPaze lokalizovane u spoljašnjoj membrani mitohondrija (Nisoli i sar., 2004; Kuzmičić i sar., 2011) koje omogućavaju fuziju mitohondrija, i Drp1 protein (*engl.* Dinamin-related protein 1, Drp1) (**Slika 7**) koji pripada velikoj porodici GTPaza koje su neophodne za deobu mitohondrija (Chan, 2006; Liesa i sar., 2009).



Slika 7. Deoba i fuzija mitohondrija. Drp1 pripada porodici velikih GTPaza uključenih u deobu mitohondrija. Ovi proteini formiraju velike multimerne koji imaju oblik prstena i hidrolizom GTP omogućavaju nastanak dve nove mitohondrije. Mfn2 ima suprotnu ulogu, prvenstveno omogućava proces fuzije mitohondrija. Modifikovano iz: Russell i sar., 2005. *J Mol Cell Cardiol.* 38: 81-91.

Visoka termogena aktivnost BAT zahteva dobro razvijenu kapilarnu mrežu koja će omogućiti brzo snabdevanje kiseonikom i supstratima kao i odvođenje toplote do ciljnih organa i tkiva. Brojni su radovi koji govore o komunikaciji endotelskih ćelija i preadipocita i/ili mrkih adipocita preko autokrinih i parakrinih signala, komponenata vanćelijskog matriksa i međućelijskih veza (Varzaneh i sar., 1994; Crandall i sar., 1997; Hutley i sar., 2001).

VEGF (*engl.* vascular endothelial growth factor) je neophodan faktor formiranja krvnih sudova kod adulta i tokom razvića (Hausman i Richardson, 2004; Petrović i sar., 2011) koji ostvaruje brojne uloge dovodeći do procesa proliferacije i diferencijacije endotelskih prekursorskih ćelija, angiogenog remodeliranja i vaskulogeneze (Adams i Alitalo, 2007).

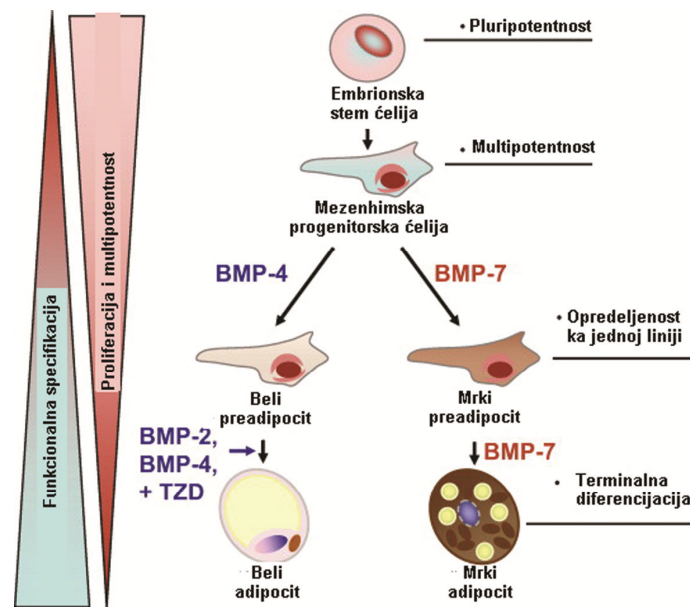
Dugotrajno izlaganje hladnoći indukuje ekspresiju VEGF u BAT i povećava prokrvljenost (Korać i sar., 2008) i stimuliše njegovu sekreciju *in vitro* (Fredriksson i sar., 2005). Iako smo u našim prethodnim radovima pokazali da su adipociti i endotelske ćelije u neodvojivoj strukturno-funkcionalnoj vezi u BAT, kako tokom aktivacije tako i tokom inaktivacije tkiva (Korać i sar., 2008; Markelić i sar., 2011), nije poznato da li se procesi adipo- i angiogeneze pokreću istovremeno tokom prvih sati izlaganja hladnoći.

Novija istraživanja fokusirana na regulaciju mehanizama uključenih u proces angiogeneze i na moguću implikaciju u patološkim stanjima kao što je kancer, pokazala su da endoglin (CD105), transmembranski glikoprotein i komponenta receptornog kompleksa faktora transformacije rasta β (*engl.* Transforming Growth Factor- β , TGF- β), predstavlja važan marker proliferacije endotelskih ćelija (Fonsatti i Maio, 2004). Iako njegova precizna uloga nije razjašnjena, istraživanja ukazuju na uključenost ovog citokina u angiogenezi (Barnabeu i sar., 2007). Da li je ovaj faktor eksprimiran u BAT i da li izlaganje hladnoći dovodi do njegove indukcije do sada nije poznato.

1.3. OSTALI FAKTORI UKLJUČENI U ADIPOGENEZU

Pored transkripcionih faktora, na proliferaciju i diferencijaciju BAT utiču i brojni drugi faktori, kao što su različiti citokini, insulin i insulinu-sličan faktor rasta (Korać i sar., 2003; Markelić i sar., 2011), brojni vanćelijski signali, među kojima posebnu važnost imaju BMP proteini (*engl.* bone morphogenic proteins).

BMP su članovi TGF- β superfamilije, i po otkriću pokazano je da stimulišu program diferencijacije osteogenih ćelija i da imaju važnu ulogu u kontroli embrionalnog razvića. Danas se zna da pored toga BMP kontrolišu opredeljivanje stem ćelija ka različitim ćelijskim linijama, što je pokazano i u WAT i u BAT (**Slika 8**). Pokazano je da mrki preadipociti eksprimiraju nekoliko članova ove proteinske familije: BMP2, BMP4, BMP6 i BMP7 i da su zaduženi za indukciju akumulacije lipida, dok samo BMP7 ima sposobnost da indukuje UCP1 i RNK ekspresiju (Tseng i sar., 2008).



Slika 8. Uloga BMP proteina u opredeljivanju prekursorskih ćelija tokom procesa diferencijacije adipocita. Ukoliko eksprimira BMP7, zajednički multipotentni prekursor može da se diferencira u pravcu mrkih adipocita, dok ekspresija BMP4 vodi ka diferencijaciji u beli adipocit. Modifikovano iz: Schulz i Tseng, 2009. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20: 523-31.

1.4. POREKLO MRKIH ADIPOCITA

Dugo se smatralo da mrki i beli adipociti potiču od zajedničke prekursorske ćelije jer za proces diferencijacije oba tipa ćelija zahtevaju ekspresiju PPAR γ . Konverzija mrkih adipocita u bele i obrnuto – transdiferencijacija, koja se dešava u određenim depovima masnog tkiva i pri određenim stimulusima kao što su hladnoća i tireoidni hormoni, dodatno je potkrepljivala ovakav stav (Cinti, 2009).

Međutim, Timmons i saradnici (2007) su objavili rezultate rada u kome su pokazali da mrki adipociti ekspimiraju Myf5 (*engl.* myogenic regulatory factor 5) i da imaju svojstva mišićnih ćelija, ukazujući na mogućnost miogenog porekla. Godinu dana kasnije Seale i sar., (2008) su pokazali da mrki adipociti vode poreklo od Myf5-pozitivnih miogenih prekursora i da PRDM16 (*engl.* PRD1-BF1-RIZ1 homologous domain-containing 16) transkripcioni faktor reguliše diferencijaciju ovih prekursora u pravcu razvoja mrkih adipocita ili poprečno-prugastih mišićnih ćelija. Indukcija PRDM16 u ovoj studiji zavisi najvećim delom od BMP7, kao i od ekspresije PPAR γ i C/EBP proteina. Takođe, ekspresija PRDM16 u WAT *in vivo* može da dovede do pojave ćelija sa karakterističnom morfologijom mrkih adipocita koji ekspimiraju UCP1, *Cidea* i PGC-1 α , koji su specifični za mrke adipocite (Seale i sar., 2008).

Sa druge strane, podaci ukazuju na zajedničko poreklo mrkih adipocita i endotelskih ćelija BAT (Tran i sar., 2012).

1.5. MRKO MASNO TKIVO ČOVEKA

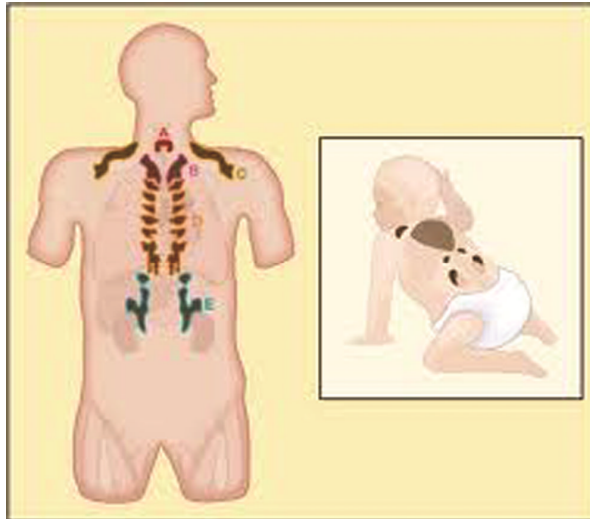
Do nedavno je smatrano da BAT nema veći značaj kod odraslih ljudi, ali novija istraživanja su pokazala prisustvo metabolički aktivnog BAT kod značajnog procenta ljudi, kao i da je količina ovog tkiva obrnuto proporcionalna indeksu telesne mase (*engl.* body mass index,

BMI) i da se aktivira izlaganjem hladnoći (Nedergaard i sar., 2007; Cypess i sar., 2009; Virtanen i sar., 2009). Ovo saznanje u potpunosti je promenilo sliku o humanom BAT. Zbog potencijalne uloge u gojaznosti i oboljenjima koja su sa njom u vezi, interesovanje za mehanizme nastanka i razvoja ovog tkiva je značajno poraslo poslednjih nekoliko godina.

Do sada je postignut značajan napredak u definisanju transkripcionih faktora koji kontrolišu terminalnu diferencijaciju preadipocita u zrele mrke adipocite. Međutim, mehanizmi koji dovode do diferencijacije mezenhimske stem ćelije (MSC) u preadipocite nisu poznati. Istraživanja sa jedne strane otežava nedostatak molekulskih markera koji su karakteristični za preadipocite, a sa druge strane njihova morfološka heterogenost unutar istih depoa BAT, a naročito heterogenost u pogledu adipogenog potencijala (Lefebvre i sar., 1998; Kajimura i sar., 2010).

Literaturni podaci pokazuju da razviće BAT kod čoveka počinje oko XX nedelje gestacije i nastavlja se još neko kratko vreme po rođenju, kada čini 1% ukupne telesne mase (Avram i sar., 2005). Kod fetusa i novorođenčadi BAT se sreće u definisanim regionima u telu oko srca i velikih krvnih sudova, traheje, jednjaka; prisutno je u području aksile, oko bubrega, nadbubrega i pankreasa, a naročito u interskapularnom regionu (**Slika 9**) (Gesta i sar., 2007).

Za razliku od pacova koji se rađaju sa nezrelom hipotalamo-hipofiznom osom, i koji se po rođenju grupišu zajedno u cilju održavanja telesne temperature, čovek se rađa sa oformljenom hipotalamo-hipofiznom osom. Samim tim, količina UCP1 kod ljudi je najveća po rođenju, što olakšava prelazak na neonatalnu termoregulaciju, dok se kod pacova ekspresija UCP1 povećava posle rođenja (Cannon i sar., 1988).

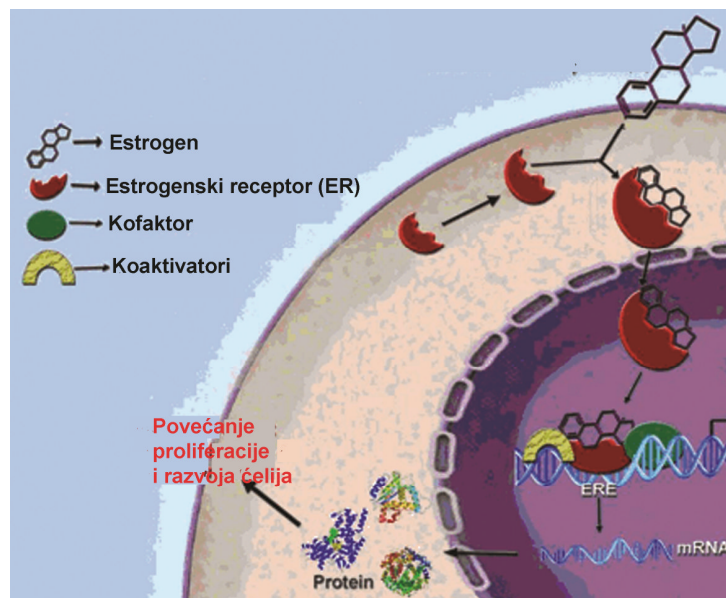


Slika 9. Lokalizacija BAT kod čoveka. Kod fetusa i novorođenčadi BAT se sreće u definisanim oblastima tela i najzastupljenije je u interskapularnom regionu. Novija istraživanja su pokazala prisustvo metabolički aktivnog BAT kod odraslih, što je dovelo do povećanog interesovanja za proučavanje mehanizama koji se nalaze u osnovi adipogeneze. Modifikovano iz: *Enerback, 2010. Cell Metabolism. 11: 248-52.*

Dosadašnji literaturni podaci o mehanizmima regulacije razvoja fetalnog BAT (fBAT) proizilazili su iz studija na životinjama, uglavnom pacova. Sada, kada je pokazano prisustvo BAT kod adulta, fBAT predstavlja važan model za proučavanje mehanizama koji dovode do hiperplazije ovog tkiva, obzirom da u ovom stanju uvećanje BAT nije indukovano hladnoćom.

Smatra se da su hormoni glavni regulatori razvića i funkcije BAT i pored noradrenalina i insulina, estrogen ima centralni efekat u regulaciji potrošnje energije kako kod ženskog tako i kod muškog pola (Frayn i sar., 2003; Pallottini i sar., 2008). Estrogen ima važnu ulogu u metabolizmu BAT regulišući lipogeni i lipolitički put. Pored toga estrogen moduliše ekspresiju adipogenih transkripcionih faktora, kao i proliferaciju i diferencijaciju adipocita (Rodriguez-Cuenca i sar., 2005). Nedostatak estrogena je praćen smanjenjem UCP1 ekspresije kod pacova i poremećajem termogeneze (Monjo i sar., 2003). Činjenica da estrogen ima važnu ulogu u determinaciji broja adipocita u WAT ukazuje na njegovu ulogu u adipogenezi (Cooke i Naaz, 2004).

Svoju fiziološku funkciju estrogen ostvaruje preko dva receptora, estrogenskog receptora alfa (ER α) i beta (ER β). Ovi receptori pripadaju superfamiliji nukleusnih receptora i funkcionišu kao ligand-zavisni transkripcioni faktori (**Slika 10**). Nakon vezivanja liganda, receptori dimerizuju, formirajući homo- i/ili heterodimere. Kompleks ligand-receptor ulazi u nukleus gde se vezuje za ERE (*engl.* estrogen response element) mesto u promotoru ciljnih gena (Heine i sar., 2000; Matthews i Gustafsson, 2003). Pokazano je da su oba tipa receptora eksprimirana u WAT i da je samo ER α eksprimiran u preadipocitima (Joyner i sar.; 2001; Deroo i Korach, 2006).



Slika 10. Regulacija genske ekspresije estrogenom. Najvećim delom estrogen ostvaruje direktan efekat regulišući ekspresiju gena u nukleusu vezivanjem zajedno sa receptorom za ERE mesto u regulatornim delovima ciljnih gena. Modifikovano iz: Kumar i Kumar, 2008. *Cancer Therapy*. 6: 655-64.

2.CILJ ISTRAŽIVANJA

Svetska epidemija gojaznosti kao i oboljenja koja su u vezi sa njom, izazvali su talas interesovanja za proučavanje biologije masnog tkiva poslednjih dvadeset godina. Ova proučavanja su dodatno potkrepljena novim istraživanjima koja su pokazala da je fiziološki aktivno BAT prisutno kod odraslih ljudi i da se ono može stimulisati izlaganjem hladnoći, što predstavlja mogućnost pronalaska načina regulacije potrošnje energije.

U tom kontekstu, ispitaće se ekspresija proteina odgovornih za stvaranje fenotipa mrkih adipocita (UCP1, PPAR γ i PGC-1 α) ali i drugih transkripcionih faktora uključenih u proces adipogeneze tokom prvih sati hladnoćom indukovane hiperplazije kod pacova kao i tokom razvoja humanog fBAT. Pored toga, biće ispitivana njihova posttranslaciona regulacija, pre svega proteina uključenih u proces biogeneze mitohondrija.

Takođe, sprovedeće se detaljna ultrastrukturna, imunocito- i imunohistohemijska analiza BAT u cilju utvrđivanja uticaja izlaganja hladnoći na proliferaciju i diferencijaciju ćelija, angiogenezu i mitohondriogenezu kao i utvrđivanje usklađenosti ekspresije gena sa odgovarajućim strukturnim promenama.

Iz tog razloga, ispitivanje molekulskih osnova integracije različitih proadipogenih i antiadipogenih transkripcionih faktora, kao i odgovora ključnih regulatornih gena termogeneze tokom ranih sati izlaganja hladnoći i fetalnog razvoja BAT izvešće se u cilju boljeg razumevanja mehanizama koji se nalaze u osnovi hiperplastičnog odgovora BAT.

3. MATERIJAL I METODI

3.1. PLAN EKSPERIMENTA

Transkripciona regulacija hiperplazije BAT ispitivana je na modelu izlaganja životinja hladnoći kao i tokom razvoja BAT u fetalnom periodu kod ljudi.

3.1.1. Model hiperplazije BAT pacova indukovane hladnoćom

U eksperimentu su korišćeni mužjaci pacova Mill Hill soja, starosti 60 dana, sa telesnom masom na početku eksperimenta 200 ± 10 g. U toku eksperimenta životinje su hranjene briketiranom hranom i vodom *ad libitum* uz pravilan dnevno noćni ritam. Eksperiment je odobren od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu.

Životinje su podeljene na ukupno sedam eksperimentalnih grupa a svaku eksperimentalnu grupu činilo je po šest životinja. Prva grupa, označena kao kontrolna je sve vreme trajanja eksperimenta boravila na sobnoj temperaturi (22 ± 1 °C). Preostalih šest grupa izlagano je hladnoći (4 ± 1 °C) u različitom trajanju. Životinje su žrtvovane u isto vreme, nakon 3, 6, 12, 24, 48 i 72 sata izlaganja hladnoći, odnosno 72 sata boravka na sobnoj temperaturi (kontrola).

Interskapularni depo BAT izolovan je u celosti i nakon čišćenja od WAT, veziva i mišića, deo tkiva je odvajan i pripreman za svetlosnu i elektronsku mikroskopiju, dok je preostali deo korišćen za Western blot i RT-PCR (*engl.* real-time polymerase chain reaction) analizu.

3.1.2. Hiperplazija BAT čoveka tokom fetalnog razvoja

U eksperimentu su korišćeni uzorci humanog BAT fetusa muškog pola, starosti XV-XXIII nedelje. fBAT je uzet odmah po obavljenom medicinski indukovanom prekidu trudnoće. Nakon rutinske provere zdravstvenog stanja majki i histopatoloških i genetičkih analiza kojima su isključeni poremećaji u razvoju fetusa odabrani su uzorci za analizu. Eksperiment je odobren od strane Komisije za etičnost ispitivanja na ljudima Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

Deo fBAT uzet iz aksilarnog regiona je očišćen od okolnog tkiva i pripremljen za Western blot analizu, dok je drugi deo pripremljen za svetlosnu i elektronsku mikroskopiju.

3.2. RT-PCR ANALIZA TKIVA

3.2.1. Priprema tkiva za RT-PCR

Prvi korak u pripremi tkiva za RT-PCR jeste izolovanje RNK. U tu svrhu, tkivo je homogenizovano u TRIzol reagensu (Invitrogen, SAD), monofaznom rastvoru fenola i guanidin-izotiocijanata, koji razara ćelije ne remeteći integritet RNK. Zatim je homogenat inkubiran sa hloroformom (za odvajanje faza) na sobnoj temperaturi, 2-3 min, pa centrifugiran na 10000 g, 15 min, na 4 °C. Gornjem vodenom sloju supernatanta je dodat izopropil alkohol da precipitira RNK (preko noći na -80 °C). Talog dobijen nakon centrifugiranja na 12000 g, 10 min, 4 °C, ispran je 75% etanolom za odstranjivanje tragova fenola. Po centrifugiranju na 7500 g, 5 min, na 4 °C u talogu je dobijena RNK koja je rastvarana u DEPC (dietilpirokarbonat, ICN, Srbija) vodi.

Nakon izolacije ukupne RNK, vršeno je njeno prečišćavanje DNKaznim tretmanom komercijalnim DNA-free™ kompletom (Ambion, SAD).

Jednolančana cDNK je sintetisana iz 1 µg RNK i 0.5 µg oligo(dT) prajmera (Invitrogen, SAD) korišćenjem 100 U M-MLV reverzne transkriptaze (Promega, SAD).

3.2.2. RT-PCR u realnom vremenu

Za određivanje promena na nivou iRNK u BAT pacova korišćen je metod RT-PCR u realnom vremenu. Relativna ekspresija je određena direktnim poređenjem dobijenih Ct vrednosti, koje su normalizovane prema endogenoj kontroli. Ct vrednost se definiše kao tačka u kojoj amplifikaciona kriva seče "threshold" (threshold cycle) vrednost i predstavlja broj ciklusa kada amplifikacija ulazi u eksponencijalnu fazu.

Pre određivanja nivoa ekspresije ciljnog gena urađeni su validacioni eksperimenti koji su pokazali približno jednako variranje promene Ct vrednosti odgovarajućeg ciljnog gena i endogene kontrole za niz serijskih dilucija cDNK. U našim uzorcima se kao adekvatna endogena kontrola pokazala 18S rRNK (*engl.* 18S ribosomal RNK). Nakon toga urađena je RT-PCR detekcija.

U RT-PCR je korišćen iQTM SYBR GreenSupermix (Bio-Rad, CA) koji sadrži 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM od svakog dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), iTaq DNK polimerazu, 50 jedinica/ml, 6 mM MgCl₂, inerkalirajuću boju - SYBR Green I, 20 nM fluorescein i stabilizatore. Sekvence prajmera su preuzete iz Banke Prajmera (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) (**Tabela 2**).

RT-PCR reakcija je izvedena u 20 µl reakcione zapremine. Svaka reakciona smeša sastojala se od: 10 µl iQTM SYBR GreenSupermix 2x, po 0.25 µl svakog od prajmera finalne koncentracije 200 nM, 0.4 µl ROX (Invitrogen, SAD) i *Nuclease free* vode do 20 µl ukupne zapremine smeše. Po 16 µl reakcione smeše i 4 µl cDNK (10 ng RNK prevedeno u cDNK) dodato je u odgovarajuće mesto na optičku ploču za RT-PCR. Za svaki set prajmera uključena je i negativna kontrola (bez cDNA), da bi verifikovali odsustvo nespecifične amplifikacije (dimere prajmera ili

kontaminaciju). Sve reakcije su izvedene na aparatu ABI Prism 7000 Sequence Detection System, pod sledećim uslovima: inicijalni korak denaturacije 3 min na 95 °C, koji je praćen sa 40 ciklusa 15 sec na 95 °C, 15 sec na 55 °C i 30 sec na 72 °C. Svaki uzorak je rađen u triplikatu, a srednja vrednost je uzeta za dalja izračunavanja. U svaku analizu je bila uključena endogena kontrola zbog korekcije internih razlika u efikasnosti amplifikacije, a svaki uzorak je normalizovan na nivo ekspresije svoje endogene kontrole.

Kvantifikacija je urađena komparativnim C_t metodom. Količina ciljnog gena, normalizovanog na nivo ekspresije svoje endogene kontrole i izražena relativno u odnosu na kalibrator, data je formulom $2^{-\Delta\Delta C_t}$, gde je $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ ciljnog gena} - \Delta C_t \text{ endogene kontrole}$. Kalibrator predstavlja kontrolni uzorak (životinje koje su boravile na sobnoj temperaturi). Rezultati su izraženi kao procenat u odnosu na adekvatnu kontrolnu grupu (grupa životinja koja je boravila na sobnoj temperaturi) kojoj je dodeljena vrednost od 100%.

3.2.3. Statistička obrada rezultata dobijenih RT-PCR analizom

Statistička značajnost dobijenih rezultata testirana je Graph Pad Software 3.03 programom. Za poređenje rezultata između grupa korišćena je ANOVA. Statistička značajnost rezultata je određivana Tukey testom. Za najniži stepen značajnosti uzeta je vrednost verovatnoće $p < 0.05$.

Tabela 2. Sekvence prajmera korišćenih u RT-PCR.

Gen	Forward	Reverse
18S rRNK	5'-CAC GGA CAG GAT TGA CAG AT-3'	5'-CAA ATC GCT TCA TCA ACT AA-3'
UCP1	5'-GTG AAG GTC AGA ATG CAA GC-3'	5'-AGA GCC CCC TTC ATG AGG TC-3'
PPARγ	5'-TTC TGG CCC ACC AAC TTC-3'	5'-CCC ACA GAC TCG GCA CTC-3'
PPARδ	5'-AGA TGG TGG CAG AGC TAT GAC-3'	5'-TCT CCT CCT GTG GCT GTT CC-3'
mtDNK	5'-TTG ATC AAC GGA CCA AGT TAC-3'	5'-CTG GAT TGC TCC GGT CTG A-3'
PGC-1α	5'-CGC ACA ACT CAG CAA GTC CTC-3'	5'-CCT TGC TGG CCT CCA AAG TCT C-3'
CEBP/α	5'-GCC AAG AAG TCG GTG GAT AA-3'	5'-CGG TCA TTG TCA CTG GTC AA-3'
Myf5	5'-GAA GGG AAG ACA AGC AGC AC-3'	5'-GCA AAA AGA ACA GGC AGA GG-3'
VEGF	5'-AAC CAT GAA CTT TCT GCT CTC TTG-3'	5'-GCC TGG CTC ACC GCC TTG GCT TGT C-3'
Endoglin	5'-GGT ACA GTG CAT CGA CAT GG-3'	5'-GCT GGC CTA GCT CTA TGG TG-3'
FABP4	5'-ATG TGT CAT GAA AGG CGT GA-3'	5'-AAA CCA CCA AAT CCC ATC AA-3'
KLF9	5'-GTC ACG ACC AGA GTG CTT CA-3'	5'-GGT GTG CTC TTG CTT GCA TA-3'
KLF15	5'-AGA GGA AGC CAT GCT GAG AA-3'	5'-GGC TCC ATT TGT CTT GCA TT-3'
BMP4	5'-GAC CCT GGT CAA CTG CGT TA-3'	5'-CTC CAC CAC CAT CTC CTG AT-3'
BMP7	5'-GCT GCC ACT AGG TCT TCC TG-3'	5'-TCA GGA GAG GTG CTT GGT CT-3'

3.3. WESTERN BLOT ANALIZA TKIVA

3.3.1. Priprema tkiva za Western blot

Tkivo je macerirano, a zatim homogenizovano u RIPA (*engl.* radio immuno precipitation buffer) (2 M NaCl, 10% Triton X-100, 0.5 M TRIS, 10% SDS, pH 7.5) puferu sa proteaznim inhibitorima (Roche, Švajcarska), tri puta deset sekundi sa deset sekundi pauze. Sonifikacija uzoraka je vršena na jačini od 10 kHz, tri puta petnaest sekundi sa po petnaest sekundi pauze. Potom je sonifikat cenrifugiran u Beckam

ultracentrifugi, 90 min na 85000 g. Dobijeni supernatanti su korišćeni za Western blot analizu.

3.3.2. Određivanje koncentracije proteina

Količina proteina je određivana po metodi Lowry i saradnika (1951). Metoda se zasniva na reakciji peptidnih veza i Cu^{++} jona u alkalnoj sredini i reakciji fosfo-molibdensko fosfo-volframovog reagensa sa aromatičnim aminokiselinama (triptofan i tirozin) u polipeptidnim lancima. Nastalo kompleksno jedinjenje plave boje ima maksimum apsorpcije na 500 nm. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji proteina koja se očitava sa standardne krive, konstruisane merenjem apsorbanace rastvora albumina na 500 nm. Koncentracija proteina se izražava u mg/ml.

3.3.3. Elektroforeza proteina

Proteini su razdvajani po molekulskim masama SDS-poliakrilamidnom elektroforezom (SDS-PAGE) u BioRad Mini-PROTEAN III sistemu. Korišćeni gelovi za razdvajanje bili su različite procentnosti, zavisno od molekulske mase traženog proteina, a gelovi za koncentrovanje 5% (5% akrilamid/bisakrilamid; 0.1% SDS; 0.125 M Tris, pH 6.8). Polimerizacija gelova je omogućena dodavanjem 0.05% amonijum persulfata (APS) i 0.033% N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED). Pufer za rezervoare se sastojao od 0.192 M glicina, 0.1% SDS i 0.025 M Tris, pH 8,3. U određenu zapreminu proteinskog rastvora dodata je jednaka zapremina pufera za uzorke (4% SDS; 20% glicerol; 10% β -merkaptoetanol; 0.125 M Tris, pH 6.8; 0.025% brom fenol plavo), a zatim su uzorci kuvani 5 min. Za detekciju VEGF na gelove je nanošeno po 15 mg proteina, dok je za praćenje ostalih proteina u eksperimentu nanošeno po 10 mg proteina. Na gelove je nanošen i proteinski marker u cilju određivanja molekulskih masa (Fermentas, SAD). Elektroforeza je trajala 60 min pri konstantnom naponu od 120V. Nakon elektroforeze, gelovi su korišćeni za Western blot.

3.3.4. Western blot

Nakon elektroforeze je vršen transfer proteina sa gelova na PVDF (*engl.* Polyvinylidene fluoride) membrane (Hybond-P, Amersham, UK). Membrane su aktivirane u metanolu (10 sec). Membrane i gelovi su pakovani i smeštani u rezervoare sa transfer puferom (0.192 M glicin, 20% metanol i 0.025 M Tris, pH 8.3). Prenos proteina sa gelova na membrane odvijao se pri konstantnom naponu od 100 V, 60 min. Uspešnost transfera je proveravana 5% Ponceau S bojom rastvorenom u glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Zatim su membrane inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi u serumu za blokiranje slobodnih mesta na membrani - 5% BSA (*engl.* bovine serum albumine) u TBS-T (0.05% Tween20 u 1.5 M NaCl, 0.2 M Tris, pH 7.4).

3.3.5. Detekcija proteina nakon Western blota

Western blot je rađen na kvantitativan način (Tienrundroj i sar., 1987). Po blokiranju, membrane su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelima rastvorenim u 5% BSA, preko noći, na 4 °C. Korišćena primarna antitela su data u **Tabeli 3**. Nakon inkubacije i ispiranja viška primarnog antitela, membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima dobijenim imunizacijom kože na IgG zeca, odnosno miša (*engl.* goat-anti rabbit, Santa Cruz Biotechnology, SAD. i goat-anti mouse, BD Bioscience Pharmingen, SAD), u razblaženju 1:2000 (antitelo: 5% BSA), 2 sata, na sobnoj temperaturi. Po inkubaciji, membrane su ispirane TBS rastvorom, 30 minuta na sobnoj temperaturi. Za vizuelizaciju proteina membrane su inkubirane u hemiluminiscentnom supstratu, luminolu, uz dodatak H₂O₂ (3 min). Nakon toga, rentgen filmovi (Hyperfilm, Amersham, UK) su izlagani ekscitovanom luminolu sa membrana (0.5-2 min). Filmovi su razvijani, pa skenirani i korišćeni za kvantifikaciju proteinskih traka.

Alternativno, membrane su inkubirane u rastvoru 4-hloro- α -naftola uz dodatak H₂O₂ do pojave traka (2-10 min), reakcija je

prekidana ispiranjem membrane u destilovanoj vodi, a membrane su potom skenirane za kompjutersku kvantifikaciju.

Tabela 3. Primarna antitela korišćena za Western blot.

Antigen	Poreklo	Proizvođač	Kataloški broj	Razblaženje
UCP1	Zečje	Abcam, UK	ab10983	1:1000
PPARγ	Zečje	Abcam, UK	ab19481	1:400
PCNA	Zečje	Santa Cruz, SAD	sc-7907	1:300
BMP7	Zečje	Abcam, UK	ab56023	4 μ g/ml
PGC-1α	Zečje	Abcam, UK	ab5448	1:1000
Drp1	Zečje	Abcam, UK	ab93942	1 μ g/ml
Mtf2	Mišje	Abcam, UK	ab56889	2 μ g/ml
VEGF	Mišje	Abcam, UK	ab68334	5 μ g/ml

3.3.6. Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom i statistička obrada rezultata

Kvantifikacija je rađena pomoću softverskog paketa ImageQuant. Rezultati izraženi putem integracije volumena predstavljaju sumu vrednosti svih piksela pobuđenih signalom (1 piksel= 0.007744 mm²) unutar označenog objekta, u našem slučaju trake, vizuelizovane na prethodno objašnjen način. Ova vrednost, umanjena za *background* tj. fon pozadine, predstavlja *volume* (tj. intenzitet zatamnjenja na celoj površini trake).

Statistička značajnost rezultata je određivana ANOVA testom. Primenom ovog testa, moguće je proceniti da li je razlika između dve grupe značajna (posledica primenjenog tretmana), ili ne (rezultat slučajne greške). Za najniži stepen značajnosti uzeta je vrednost verovatnoće $p < 0.05$.

3.4. ANALIZA TKIVA NA NIVOU SVETLOSNE MIKROSKOPIJE

3.4.1. Priprema tkiva za svetlosnu mikroskopiju

Za histološku analizu, jedan deo BAT je fiksiran u 4% neutralnom formalinu. Nakon ispiranja 24 časa česmenskom vodom, tkivo je dehidratirano kroz seriju alkohola rastuće koncentracije, prosvetljeno u ksilolu i ukalupljeno u paraplast (5 časova, na temperaturi od 58 °C). Dobijeni kalupi tkiva sečeni su serijski na preseke debljine 5 µm.

3.4.2. Imunohistohemijska tehnika detektovanja proteina streptavidin-biotin metodom

Imunohistohemijsko obeležavanje specifičnih antigena rađeno je senzitivnom tehnikom biotin/streptavidin peroksidaznog bojenja pomoću komercijalnog LSAB kompleta (Dako Scientific, Danska). Čitav postupak se odvija na sobnoj temperaturi, osim inkubacije u primarnom antitelu koja se vrši na 37 °C, 2.5h.

Preseci su deparafinisani ksilolom (2 x 5 min), a rehidratirani kroz seriju rastvora etanola opadajućih koncentracija (100% i 95%) sve do vode (sve po 5 min inkubacije). Nakon toga su inkubirani 10 minuta u 3% rastvoru H₂O₂ u metanolu, da bi se blokirala endogena peroksidaza. Po blokiranju preseci su ispirani 0.01M PBS (*engl.* phosphate-buffered saline) (0.01M Na₂HPO₄, 0.9% NaCl, pH 7.2), pa inkubirani 2.5 h u primarnom antitelu na 37 °C (vlažna sredina).

Korišćena su zečja primarna antitela na: PCNA i ERα, (Santa Cruz, SAD) u razblaženju 1:200; UCP1 (1:700), BMP7 (5 µg/ml), noradrenalin (1:500), VEGF (10 µg/ml), PPARγ (1:50) i PGC-1α (1:300) (Abcam, UK); Ki-67 razblaženja 1:30 (Dako Scientific, Danska) i ERβ razblaženja 1:1500 (GeneTex, SAD). Uklanjanje nevezanih antitela je vršeno ispiranjem u PBS, nakon čega su preseci inkubirani u biotinizovanoj smeši sekundarnih antitela - Yellow link (smeša anti-

mišjih, anti-zečjih i anti-kozjih antitela iz LSAB kompleta) tokom 25 min. Posle ispiranja u PBS izvršena je inkubacija streptavidin-HRP (*engl.* horseradish peroxidase) kompleksom - Red Streptavidin iz pomenutog kompleta, inkubiranjem tokom 25 minuta. Nakon ovoga su preseci ispirani u PBS.

Za vizuelizaciju imunokompleksa korišćen je 0.05% 3,3' diaminobenzidin (DAB, Sigma-Aldrich Chemie, Nemačka) rastvoren u PBS, u prisustvu H₂O₂. Reakcija je prekinuta posle 10 minuta ispiranjem u česmenskoj vodi. Nakon toga vršeno je kontrastno bojenje hematoksilinom i prekinuto česmenkom vodom. Po završenom bojenju, preseci su dehidratirani kroz seriju alkohola rastućih koncentracija (95%, 100%), i ksilol, pa montirani u DPX. Gotovi preparati su posmatrani i slikani na svetlosnom mikroskopu DMLB (Leica Microsystems, Nemačka).

3.4.3. Imunohistohemijska tehnika detektovanja i kolokalizacije proteina fluorescentno-obeležanim antitelima

Fluorescentna imunohistohemijska detekcija proteina u humanom fBAT izvršena je na parafinskim presecima debljine 5µm, deparafiniziranim i rehidratiranim rutinski, nakon čega se pristupilo demaskiranju epitopa i ispiraju u PBS, na isti način kao za LSAB metodu. Blokiranje nespecifičnog vezivanja je izvršeno inkubiranjem preseka u 1% rastvoru BSA u 0.1% rastvoru Triton X deterdženta u PBS, 30 min. Preseci su, bez ispiranja zatim inkubirani sa smešom primarnih antitela na ERα (Santa Cruz, SAD) u razblaženju 1:200 i ERβ (GeneTex, SAD) u razblaženju 1:1500, preko noći na 4 °C. Nakon inkubacije preseci su isprani u PBS i inkubirani fluorescentno-obeležanim odgovarajućim sekundarnim antitelima (anti-zečje/anti-mišje fluorescinom (FITC) obeleženo antitelo, zapreminskog razblaženja 1:200 (Abcam, UK); anti-zečje/anti-mišje Alexa Fluor® 568 obeleženo antitelo, zapreminskog razblaženja 1:2000, (Invitrogen, UK)), 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Po ispiranju, preseci su montirani u

Mowiol® (Polysciences, Nemačka) i analizirani na konfokalnom mikroskopu LSM 510 (Carl Zeiss, Nemačka).

Isti postupak je upotrebljen za detekciju i kolokalizaciju ER α i ER β sa PPAR γ i PGC-1 α , korišćenjem odgovarajućih sekundarnih antitela. Primarna antitela su korišćena u razblaženju 1:50 za PPAR γ (Abcam, UK) i 1:300 za PGC-1 α (Abcam, UK).

3.4.3.1. Kvantifikacija i statistička obrada rezultata kolokalizacije proteina

Kvantifikacija kolokalizacije imunofluorescentno obeleženih proteina je urađena na po deset mikrografija slikanih pod istim uslovima uz pomoć ImageJ JACoP programa izračunavanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije (r) (http://rsb.info.nih.gov/ij/plugin_s/track/jacop.html), Bolte i Cordelieres, 2006). Vrednost Pearsonovog korelacionog koeficijenta veća od 0.5 smatra se pouzdanim pokazateljem kolokalizacije između dve fluorofore, odnosno dva fluorescentno obeležena proteina (Zinchuk i Zinchuk, 2008).

Rezultati su prikazani u vidu srednjih vrednosti za svaku grupu \pm standardna greška (SE). Student t-test korišćen je za poređenje srednjih vrednosti. Za najniži stepen značajnosti uzeta je vrednost verovatnoće $p < 0.05$.

3.5. ANALIZA TKIVA NA NIVOU TRANSMISIONE ELEKTRONSKE MIKROSKOPIJE (TEM)

3.5.1. Priprema tkiva za TEM

Isecci tkiva veličine oko 1 mm³ fiksirani su 2.5% glutaraldehydom u fosfatnom puferu (0.1 M, pH 7.2) 4 časa, pa postfiksirani 2% osmijum tetroksidom u istom puferu, 4 časa na sobnoj temperaturi. Uzorci su dehidratirani serijom alkohola rastuće koncentracije i prosvetljeni u

propilen-oksidu. Kalupljenje je izvršeno u Araldit smoli (Fluka, Nemačka) 72 časa na temperaturi od 50 °C.

Dobijeni kalupi sečeni su UC6 ultramiktrotomom (Leica Microsystems, Nemačka) na tanke preseke (70 nm). Preseci su stavljeni na mrežice i kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom u EM stain aparatu (Leica Microsystems, Nemačka). Za potrebe imunocitohemijske detekcije proteina preseci su stavljeni na mrežice presvučene olovkom za poboljšanje adhezije preseka (Coat-Quick »G«, Agar Scientific Ltd, UK). Preseci su posmatrani i snimani na TEM CM12 (Philips/FEI, Holandija).

3.5.2. Imunocitohemijska metoda detekcije proteina (imunogold metoda) na nivou TEM

Za detekciju ER α i ER β na ultrastrukturnom nivou u humanom fBAT korišćena je imunocitohemijska metoda detekcije uz pomoć sekundarnih antitela obeleženih česticama zlata (imunogold metoda). Nakon otkrivanja epitopa u citratnom puferu (3 minuta na 600W) i ispiranja u 1% TBS-Tween (*engl.* Tris-buffered saline – Tween), blokirano je nespecifično vezivanje antitela inkubacijom tankih preseka u 5% rastvoru BSA u TBS-Tween, 1h na sobnoj temperaturi. Mrežice sa presecima su potom nanošene na kap primarnog antitela (anti-zečje poliklonsko na ER α i anti-mišje monoklonsko na ER β odgovarajućeg razblaženja) i inkubirane preko noći na 4 °C. Po završetku inkubacije preseci su isprani u TBS-Tween (10 puta po 1 minut) a zatim inkubirani odgovarajućim sekundarnim antitelima (anti-mišje, odnosno anti-zečje sekundarno antitelo, zapreminskog razblaženja 1:20, Abcam, SAD) obeleženim česticama zlata veličine 10 nm 1h na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije, preseci su isprani u TBS-Tween (deset puta) i destilovanoj vodi, osušeni, posmatrani i snimani na TEM CM12.

4. REZULTATI

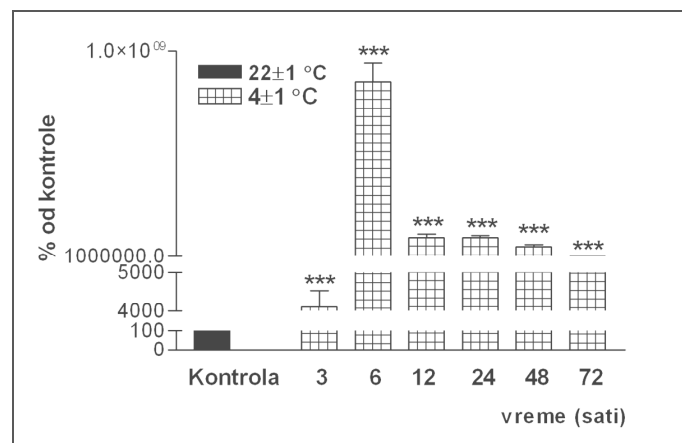
4.1. ANIMALNI MODEL IZLAGANJA HLADNOĆI

4.1.1. Efekat izlaganja hladnoći na termogeni kapacitet BAT i mitohondriogenezu

4.1.1.1. Ekspresija UCP1 u BAT

4.1.1.1.1. Količina UCP1 iRNK

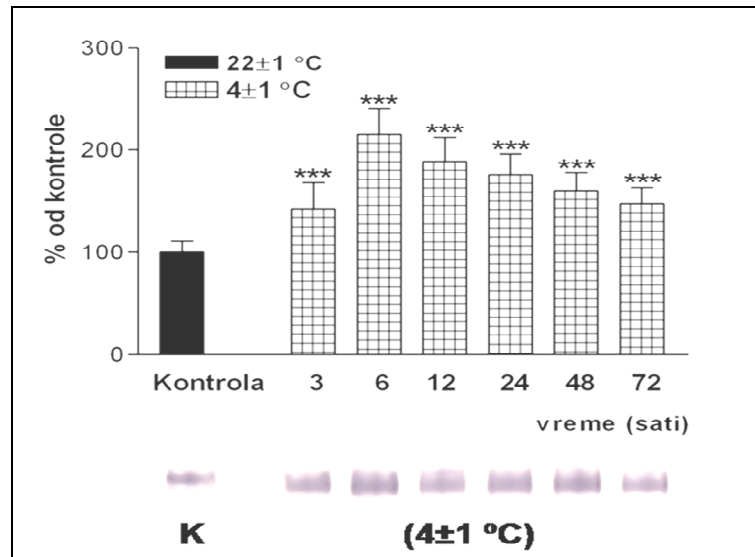
Promene količine iRNK za UCP1 prikazane su na **Grafiku 1**. Izlaganje pacova hladnoći povećava količinu UCP1 iRNK već nakon trećeg sata ($p < 0.005$) i održava se sve do kraja ispitivanog perioda. Maksimalno povećanje količine iRNK za UCP1 u odnosu na kontrolu zabeleženo je 6. sata izlaganja hladnoći.



Grafik 1. Promena količine UCP1 iRNK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0.001$.

4.1.1.1.2. Količina UCP1 proteina

Rezultati analize proteinske ekspresije UCP1 pokazuju da izlaganje hladnoći dovodi do povećanja količine UCP1 ($p < 0.001$) tokom 6-časovnog izlaganja hladnoći, kao što je slučaj sa iRNK (**Slika 11**).



Slika 11. Promena količine UCP1 proteina u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$.

4.1.1.1.3. Imunohistohemijska detekcija UCP1

U BAT pacova kontrolne grupe detektovana je blaga imunopozitivnost na UCP1 lokalizovana u citoplazmi mrkih adipocita (**Slika 12**).

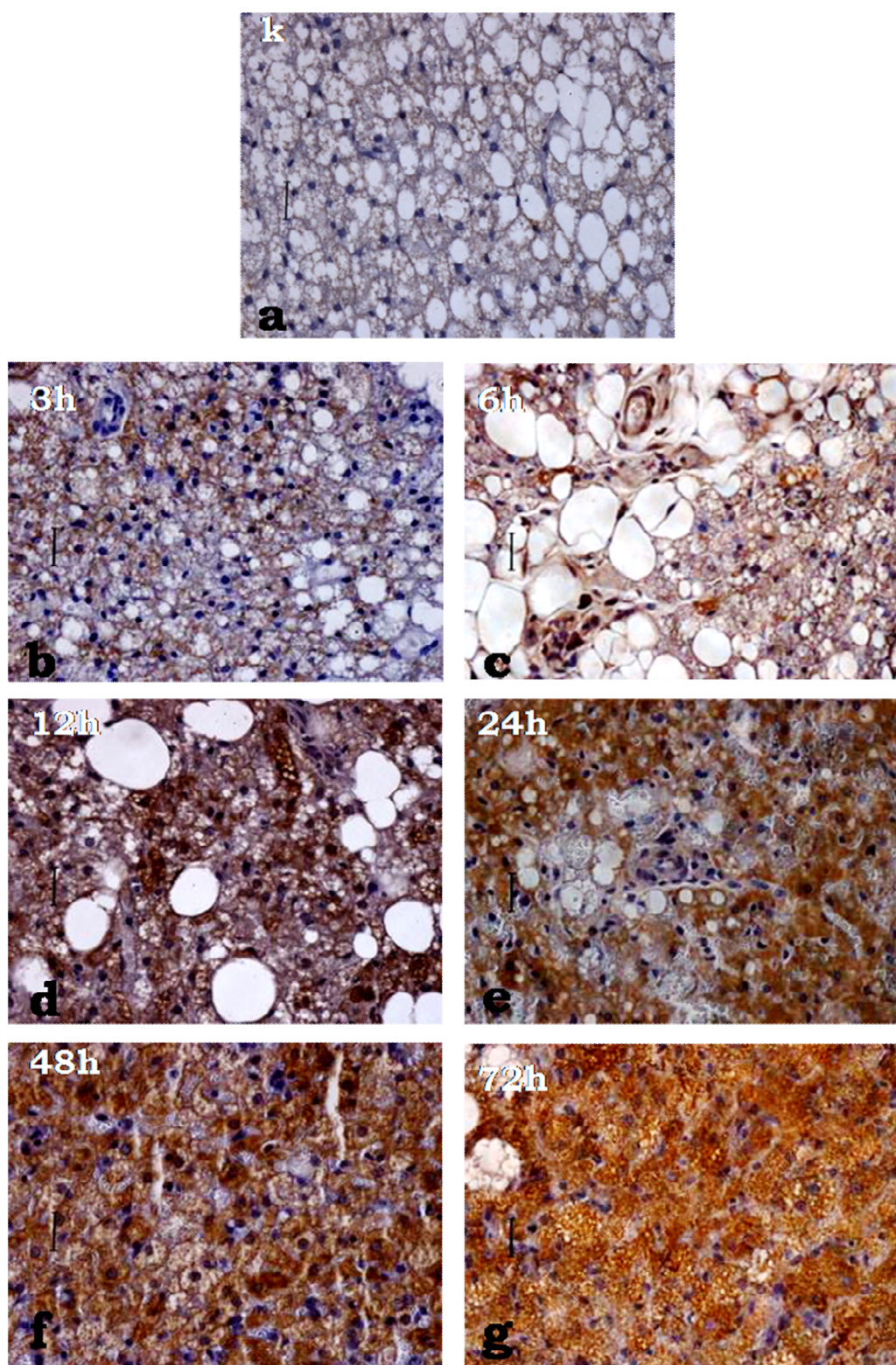
Tri sata izlaganja hladnoći snažno indukuje imunopozitivnost na UCP1 u citoplazmi mrkih adipocita, a reakcija je detektovana i u vezivno-tkivnoj stromi, naročito oko kapilara. U ovoj grupi zapaža se heterogenost među ćelijama u smislu ekspresije UCP1. Naime, u BAT se naizmenično smenjuju grupacije manjeg broja ćelija koje su UCP1 pozitivne i grupacije ćelija koje su negativne za UCP1, tzv. „Harlekin efekat“. Ovaj efekat je zapažen kod svih ispitivanih grupa, ali je najviše izražen kod grupe koja je izlagana hladnoći tri sata. Pored povećanja imunoreakcije u mrkim adipocitima, grupe koje su izlagane hladnoći 12-72 sata pokazuju reakciju i u citoplazmi unilokulusnih adipocita kao i u pojedinim endotelskim ćelijama. Pored toga, uočena je lokalizacija UCP1 u nukleusima mrkih adipocita, a najjača nukleusna imunopozitivnost zapažena je u grupi koja je izlagana hladnoći 72 sata. Lokalizacija UCP1 u nukleusima mrkih adipocita je potvrđena imunogold metodom (naši neobjavljeni podaci).

Na **slici 13** prikazane su reprezentativne mikrografije preseka tkiva grupe koja je izlagana hladnoći 72 sata na većem uveličanju. Kao što se vidi, tkivo pokazuje ćelijsku heterogenost u pogledu ekspresije UCP1, koji se eksprimira u najvećem broju mrkih adipocita ali detektovani su i mrki adipociti sa potpunim odsustvom reakcije.

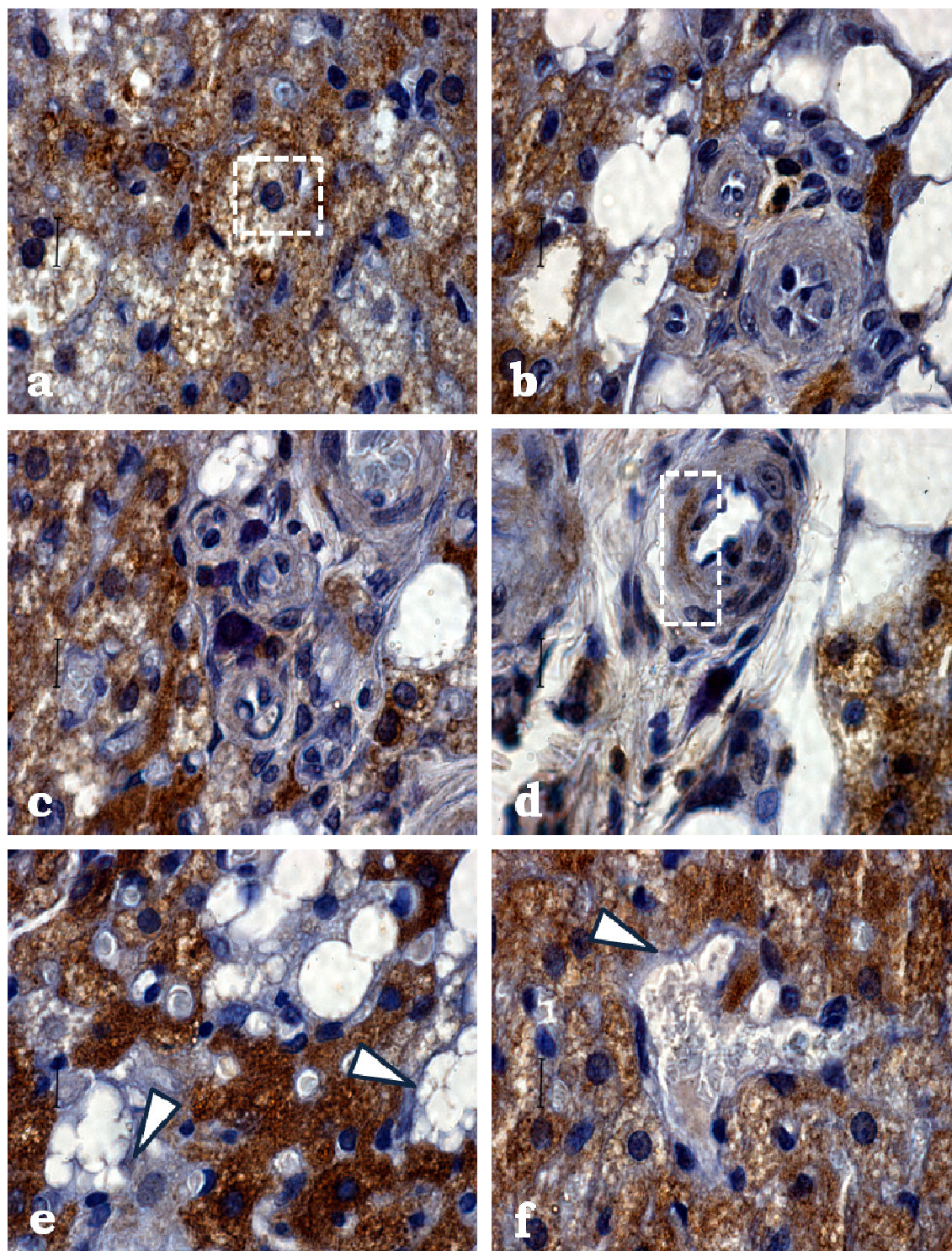
Heterogenost ćelija u pogledu ekspresije UCP1 smo zapazili ne samo u mrkim adipocitima, već i u endotelskim i glatkim mišićnim ćelijama većih krvnih sudova BAT.

4.1.1.2. Imunohistohemijska detekcija noradrenalina

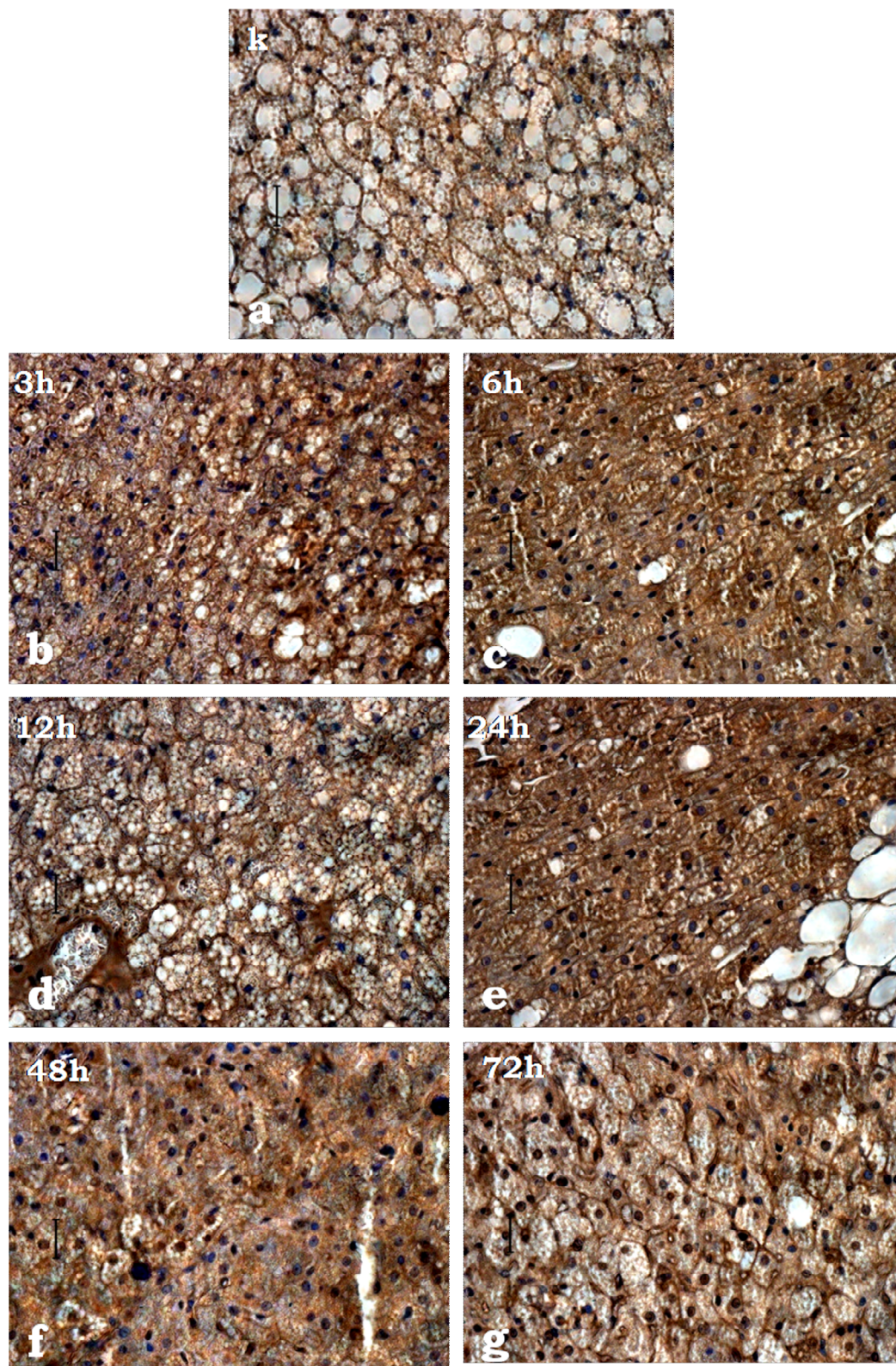
Za razliku od kontrolne grupe u kojoj je detektovana umerena imunopozitivnost za noradrenalin, u svim ispitivanim tačkama izlaganja hladnoći zabeleženo je povećanje imunoreakcije. Reakcija je detektovana u nervnim završecima, citoplazmi mrkih adipocita i endotelskih ćelija i u vezivno-tkivnoj stromi oko krvnih sudova. Sa povećanjem trajanja stimulusa reakcija na noradrenalin se detektuje i u nukleusima mrkih adipocita i endotelskih ćelija, što je posebno izraženo u grupi koja je izlagana 72 sata hladnoći, gde je reakcija najvećim delom zabeležena u nukleusima (**Slika 14**).



Slika 12. Imunohistohemijska detekcija UCP1 u BAT kontrolne grupe (a) i grupa izlaganih hladnoći (b-g). Orig. uveličanje : 40x.



Slika 13. Tkivna (ćelijska) specifičnost UCP1 ekspresije u BAT. Ekspresija UCP1 je detektovana u nukleusima mrkih adipocita (**a**), adipogeno-angiogenim klasterima (**b,c**) i glatkim mišićnim ćelijama većih krvnih sudova (**d**). Imunopozitivnost mrkih adipocita se razlikuje između ćelija (**e,f**) a detektovani su mrki adipociti (**e**) i endotelne ćelije (**f**) koje nisu pokazale imunoreaktivnost (strelice). Orig. uveličanje : 100x.

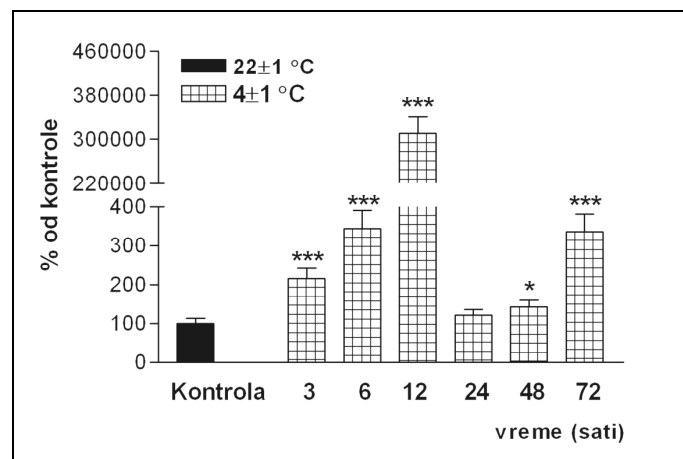


Slika 14. Imunohistohemijška detekcija noradrenalina u BAT kontrolne grupe (a) i grupa izlaganih hladnoći (b-g). Orig. uveličanje: 40x.

4.1.1.3. Ekspresija PPAR γ u BAT

4.1.1.3.1. Količina PPAR γ iRNK

U poređenju sa kontrolom, kod životinja izlaganih hladnoći detektovano je značajno povećanje ekspresije PPAR γ iRNK nakon 3, 6, 12, 72 ($p < 0.001$) i 48 sati ($p < 0.05$), dok je količina PPAR γ iRNK jednaka kontroli posle izlaganja hladnoći 24 sata (**Grafik 2**).



Grafik 2. Promena količine PPAR γ iRNK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

4.1.1.3.2. Količina PPAR γ proteina

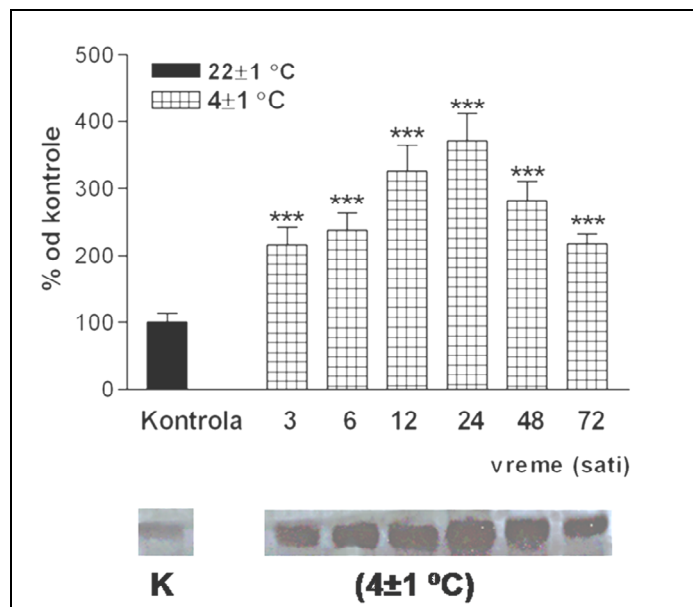
Na **sluci 15** prikazane su promene količine PPAR γ proteina u BAT. Kod svih grupa izlaganih hladnoći zabeležen je značajno viši nivo PPAR γ proteina ($p < 0.001$) u odnosu na kontrolu, a najveća vrednost je uočena kod životinja koje su izlagane 24 sata.

4.1.1.4. Ekspresija PGC-1 α u BAT

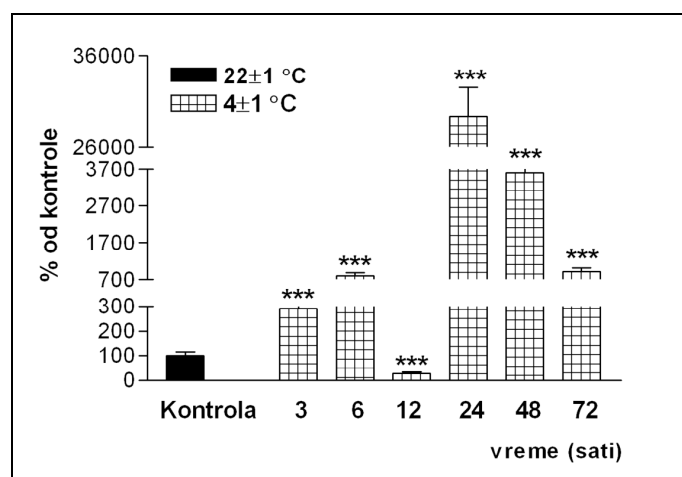
4.1.1.4.1. Količina PGC-1 α iRNK

Grafik 3 prikazuje promene količine PGC-1 α iRNK u BAT pacova tokom izlaganja pacova hladnoći. Osim grupe izlagane hladnoći 12 sati kod koje se detektuje značajno smanjenje ($p < 0.001$) u odnosu na

kontrolu, sve grupe pokazuju značajno povećanje količine PGC-1 α iRNK ($p < 0.001$).



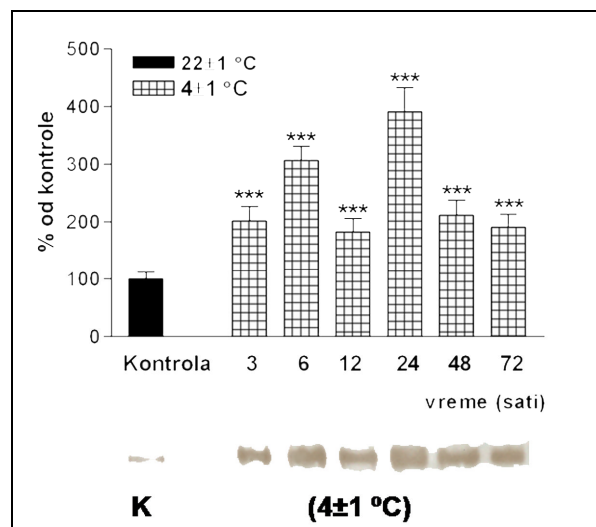
Slika 15. Promena količine PPAR γ proteina u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$.



Grafik 3. Promena količine PGC-1 α iRNK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$.

4.1.1.4.2. Količina PGC-1 α proteina

Vremenski zavisne promene količine PGC-1 α prikazane su na **slici 16**. Tokom izlaganja hladnoći detektovano je značajno povećanje PGC-1 α proteina u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolu, sa najvećom detektovanom vrednošću nakon 24 sata.



Slika 16. Promena količine PGC-1 α proteina u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$.

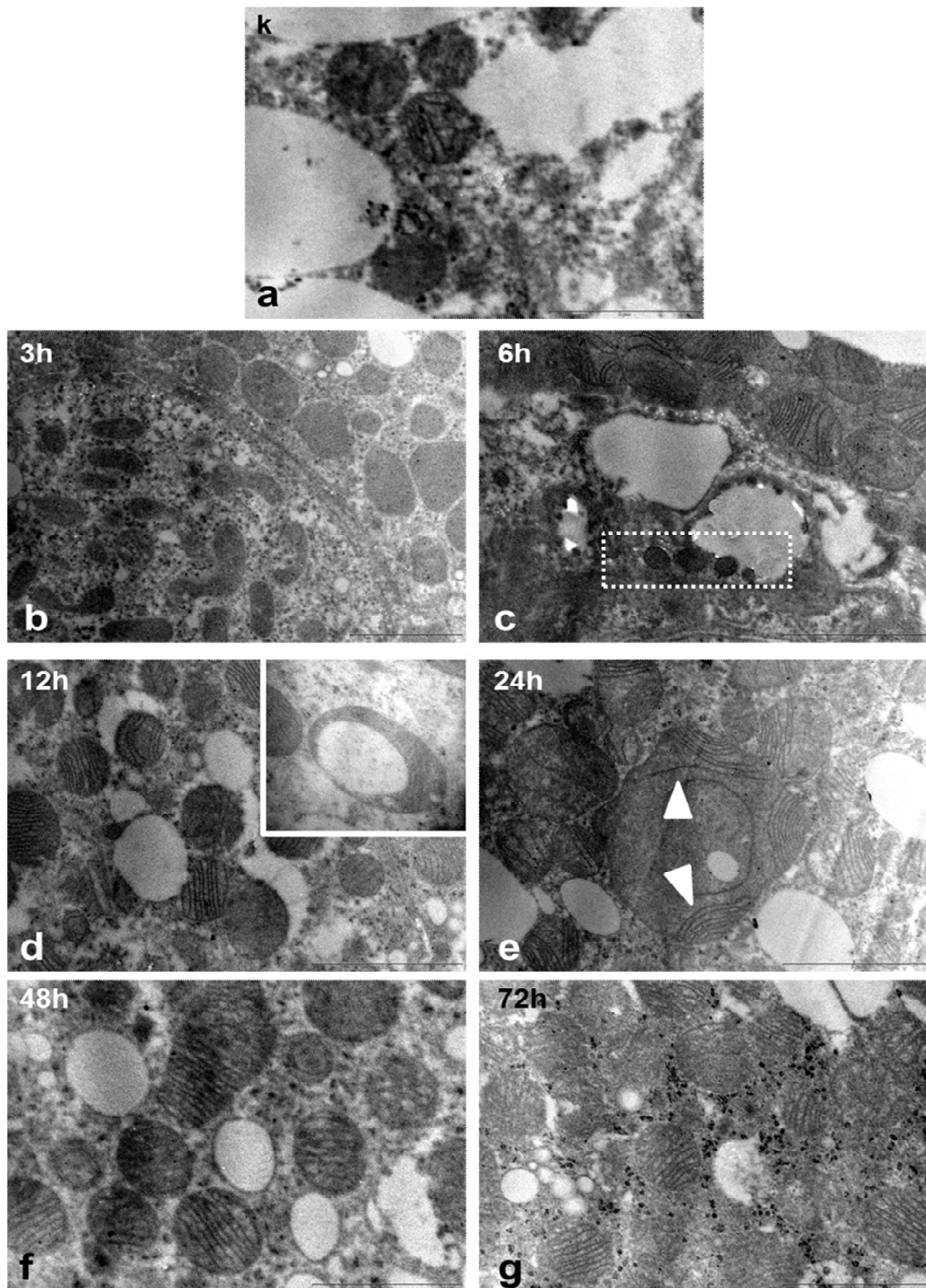
4.1.1.5. Ultrastrukturna analiza mitohondriogeneze u mrkim adipocitima

Na nivou TEM uočava se da mitohondrije mrkih adipocita kontrolne grupe variraju u pogledu veličine i oblika i da poseduju mali broj kristi slabije uređenosti (**Slika 17**).

U svim grupama koje su izlagane hladnoći povećava se broj mitohondrija koje zadobijaju pravilan, loptast oblik i povećan broj pravilno uređenih, paralelno postavljenih kristi.

Mitohondrije grupe izlagane hladnoći 3 sata pokazuju najveću heterogenost u pogledu oblika. Naime, „smenjuju“ se mrki adipociti sa klasičnim loptastim mitohondrijama i mrki adipociti sa veoma raznolikim oblicima mitohondrija, od loptastih preko izduženih do

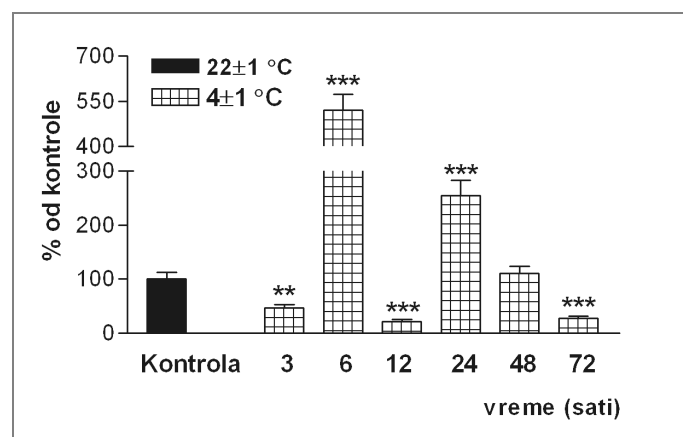
ovalnih, kao i mitohondrijama u deobi. Kriste ove grupe mitohondrija još uvek nisu u potpunosti diferencirane, za razliku od grupe koja je izlagana hladnoći 6 sati, kod koje je najveći broj mitohondrija u potpunosti termogeno osposobljen, sa velikim brojem paralelo postavljenih kristi. Pored njih uočavaju se i male, atipične mitohondrije svetlog homogenog matriksa, najčešće bez kristi. Tokom daljeg izlaganja hladnoći, pored toga što su mitohondrije brojne, uglavnom u fizičkom kontaktu sa lipidnim telima, zapažena su i brojna lipidna tela unutar mitohondrija. U svim eksperimentalnim grupama uočena je mitohondrijalna lokalizacija uz endoplazmatični retikulum. Najveći broj velikih, „megamitohondrija“ u kojima se vidi pregrupisanje kristi na polovima detektovano je u grupi izlaganoj hladnoći 24 sata.



Slika 17. Mitohondrije BAT pacova kontrolne grupe (a) i grupa izlaganih hladnoći (b-g). Izlaganje hladnoći dovodi do pojave mitohondrija različitih oblika (b) i veličine (c). Mitohondrije su često lokalizovane uz lipidna tela dok se manja lipidna tela mogu uočiti u nekim mitohondrijama (c-insert). Pojava pravilno uređenih, paralelno postavljenih kristi je uočena u svim grupama izlaganih hladnoći. Grupa izlagana hladnoći 24 sata pokazala je najveću učestalost pojave velikih mitohondrija u kojima se zapaža pregrupisavanje kristi ka polovima (strelice). Orig. uveličanje: 15000x, (d-insert): 31000x.

4.1.1.6. Količina mtDNK

U odnosu na kontrolnu grupu, količina mtDNK se značajno smanjuje kod grupa izlaganih hladnoći 3, 12, i 72 sata ($p < 0.001$), a značajno povećanje se uočava 6. i 24. sata ($p < 0.005$). Najveća vrednost količine mtDNK je pokazana u grupi koja je izlagana hladnoći 6 sati dok grupa koja je izlagana 48 sati nije pokazala promene, odnosno održala je nivo mtDNK na kontrolnom nivou (**Grafik 4**).



Grafik 4. Promena količine mtDNK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

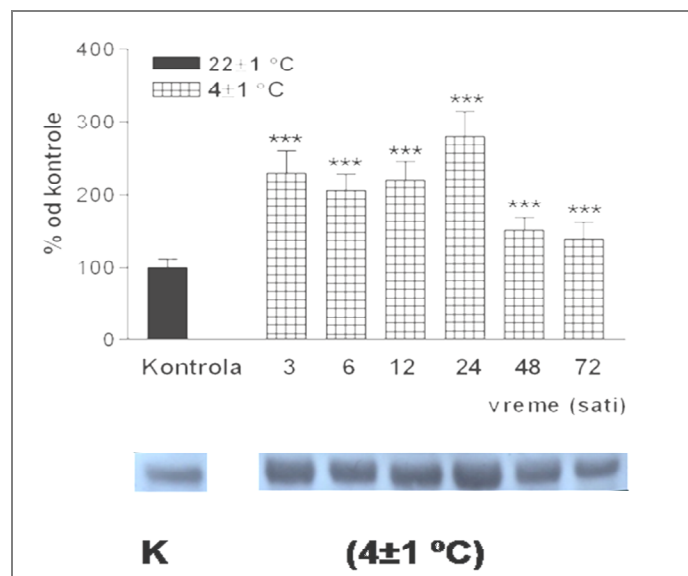
4.1.1.7. Količina Drp1 proteina

Promene količine Drp1 proteina prikazane su na **slici 18**. U poređenju sa kontrolom, izlaganje životinja hladnoći značajno ($p < 0.001$) povećava količinu Drp1 proteina u svim ispitivanim vremenskim tačkama. Maksimalna vrednost je pokazana u grupi životinja koje su izlagane hladnoći 24 sata.

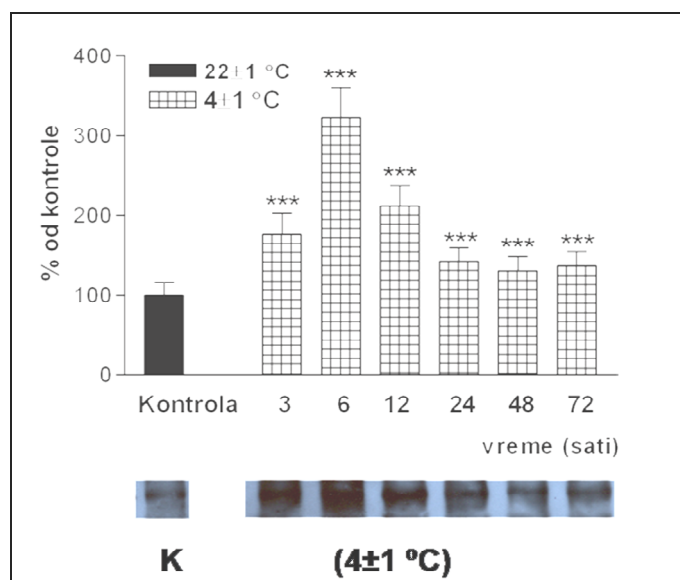
4.1.1.8. Količina Mfn2 proteina

Rezultati proteinske ekspresije mitofuzina 2 (**Slika 19**) pokazuju da izlaganje hladnoći povećava količinu mitofuzina u svim ispitivanim

tačkama ($p < 0.001$). Najveća zapažena proteinska ekspresija zabeležena je nakon 6 sati izlaganja hladnoći.



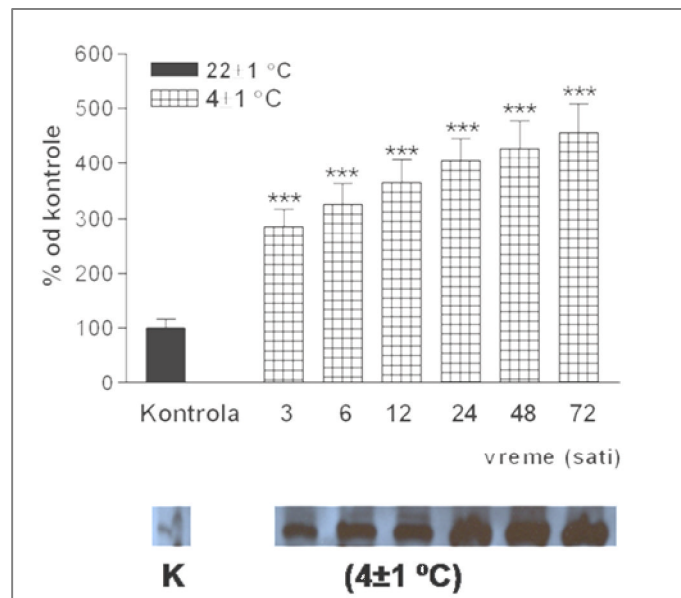
Slika 18. Promena količine Drp1 proteina u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0.001$.



Slika 19. Promena količine Mfn2 proteina u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0.001$.

4.1.1.9. Količina NRF1 proteina

Slika 20 prikazuje da izlaganje hladnoći povećava količinu proteina NRF1 u svim ispitivanim tačkama u poređenju sa kontrolom ($p < 0.001$).



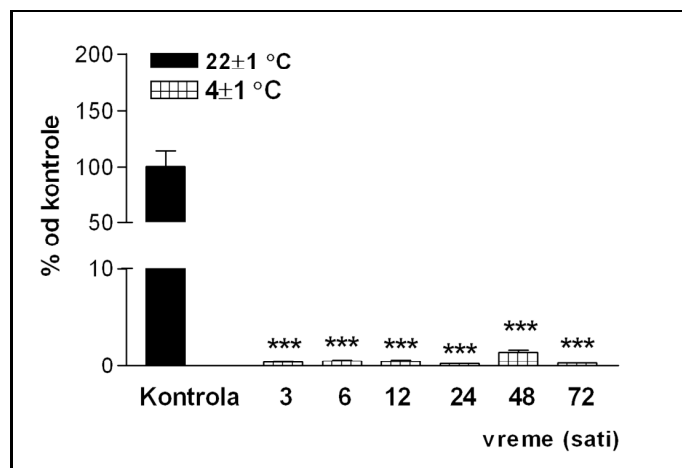
Slika 20. Promena količine Nrf1 proteina u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$.

4.1.2. Efekat izlaganja hladnoći na proliferaciju i diferencijaciju ćelija adipogenog pula u BAT

4.1.2.1. Ekspresija CEBP/α

4.1.2.1.1. Količina CEBP/α iRNK

RT-PCR analiza za CEBP/α prikazana je na **grafiku 5**. Nivo transkripta za CEBP/α izrazito je manji u svim ispitivanim tačkama eksperimenta tokom izlaganja hladnoći ($p < 0.001$) koje skoro u potpunosti gasi transkripciju ovog gena u BAT pacova.

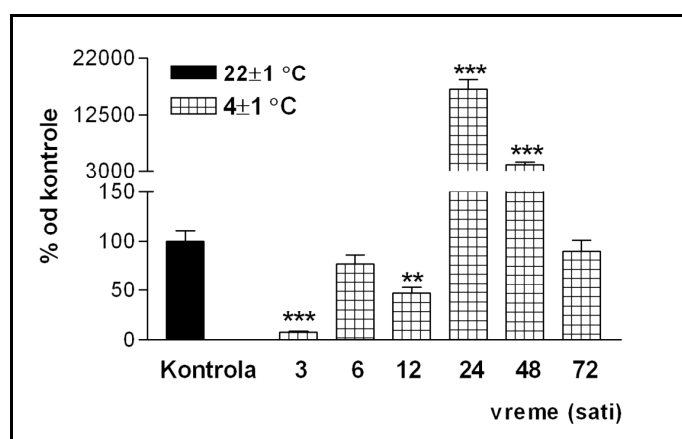


Grafik 5. Promena količine CEBP/α iRNAK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom ***p<0.001.

4.1.2.2. Ekspresija PPARδ

4.1.2.2.1. Količina PPARδ iRNAK

Grafik 6 prikazuje značajno variranje u količini PPARδ iRNAK među različitim tačkama izlaganja hladnoći. Izlaganje hladnoći 3 (p<0.001) i 12 sati (p<0.01) snižava količinu transkripta u BAT pacova, dok izlaganje 24 i 48 sati povećava količinu PPARδ iRNAK (p<0.001). U grupi životinja koje su izlagane hladnoći 6 i 72 sata količina iRNAK PPARδ je na nivou kontrolne grupe.

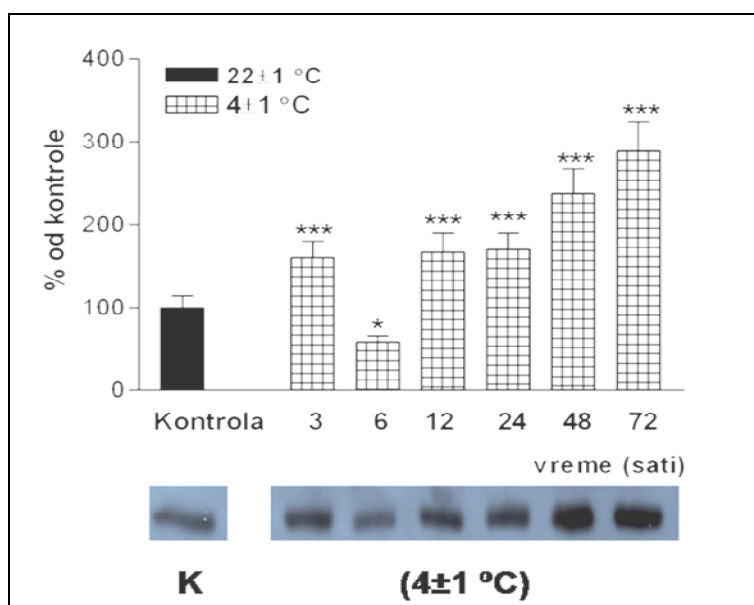


Grafik 6. Promena količine PPARδ iRNAK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom ***p<0.005; **p<0.05.

4.1.2.3. Ekspresija PCNA

4.1.2.3.1. Količina PCNA proteina

Promene količine PCNA proteina prikazane su na **slici 21**. U poređenju sa kontrolom, izlaganje životinja hladnoći ($p < 0.001$) pokazuje tendenciju rasta ekspresije PCNA proteina u svim ispitivanim vremenskim tačkama, osim 6. sata, kada je detektovano značajno smanjenje ($p < 0.05$).



Slika 21. Promena količine PCNA proteina u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

4.1.2.3.2. Imunohistohemijska detekcija PCNA

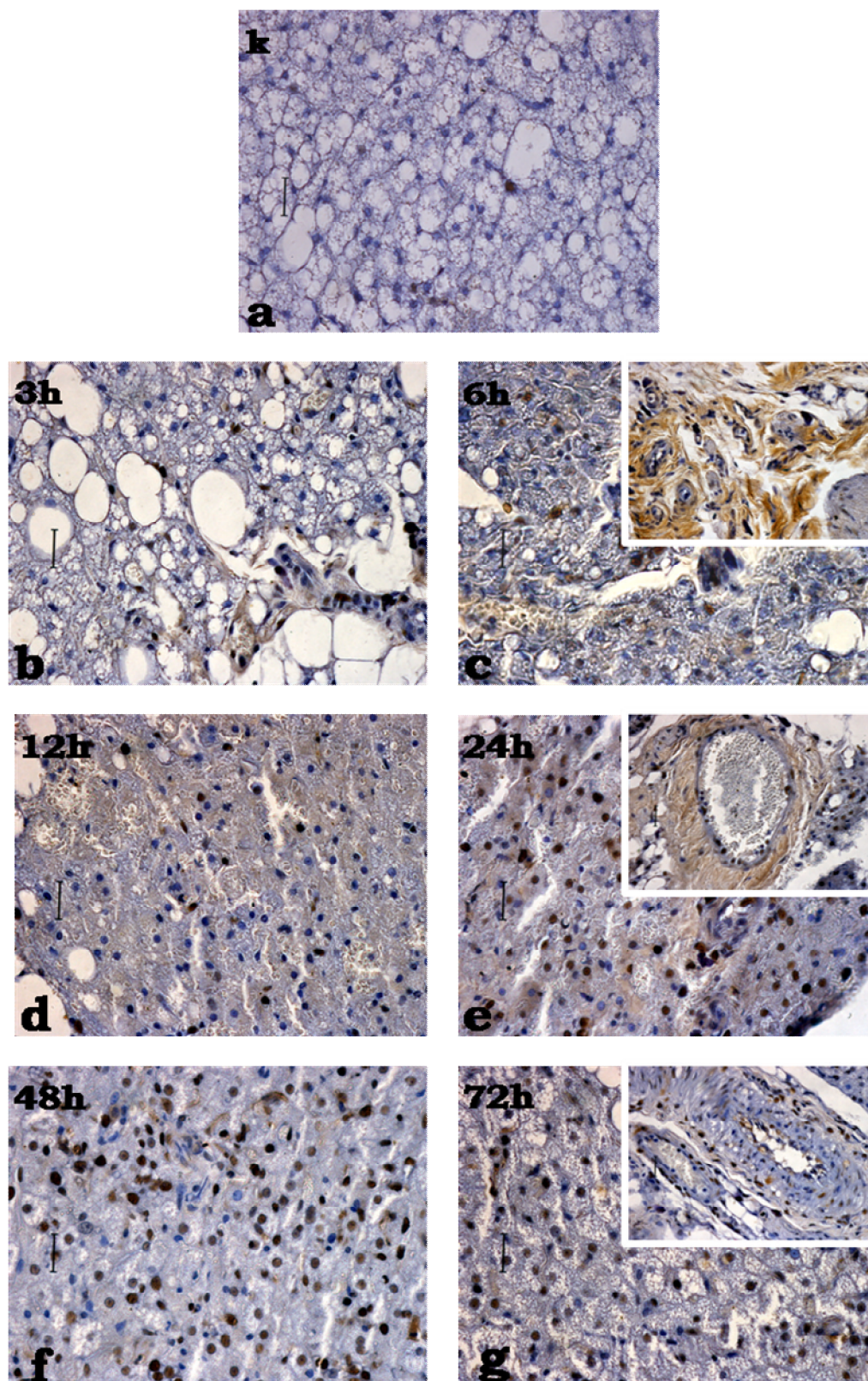
BAT kontrolne grupe životinja pokazalo je veoma blagu imunopozitivnost za PCNA (**Slika 22**), prevashodno u vezivno-tkivnoj stromi ali i u manjem broju nukleusa mrkih adipocita. Međutim, već od 3. sata izlaganja hladnoći zapažena je snažna indukcija PCNA imunoreaktivnosti, povećanjem broja PCNA pozitivnih nukleusa endotelskih, prekursorskih i ćelija mrkih adipocita i pojavom jake reakcije u vezivno-tkivnoj stromi. Isti obrazac reakcije detektovan je u svim ostalim ispitivanim tačkama, uz pojavu blage citoplazmatske

reakcije. Najveći broj nukleusa pozitivan za PCNA je pokazan u grupi koja je izlagana hladnoći 72 sata.

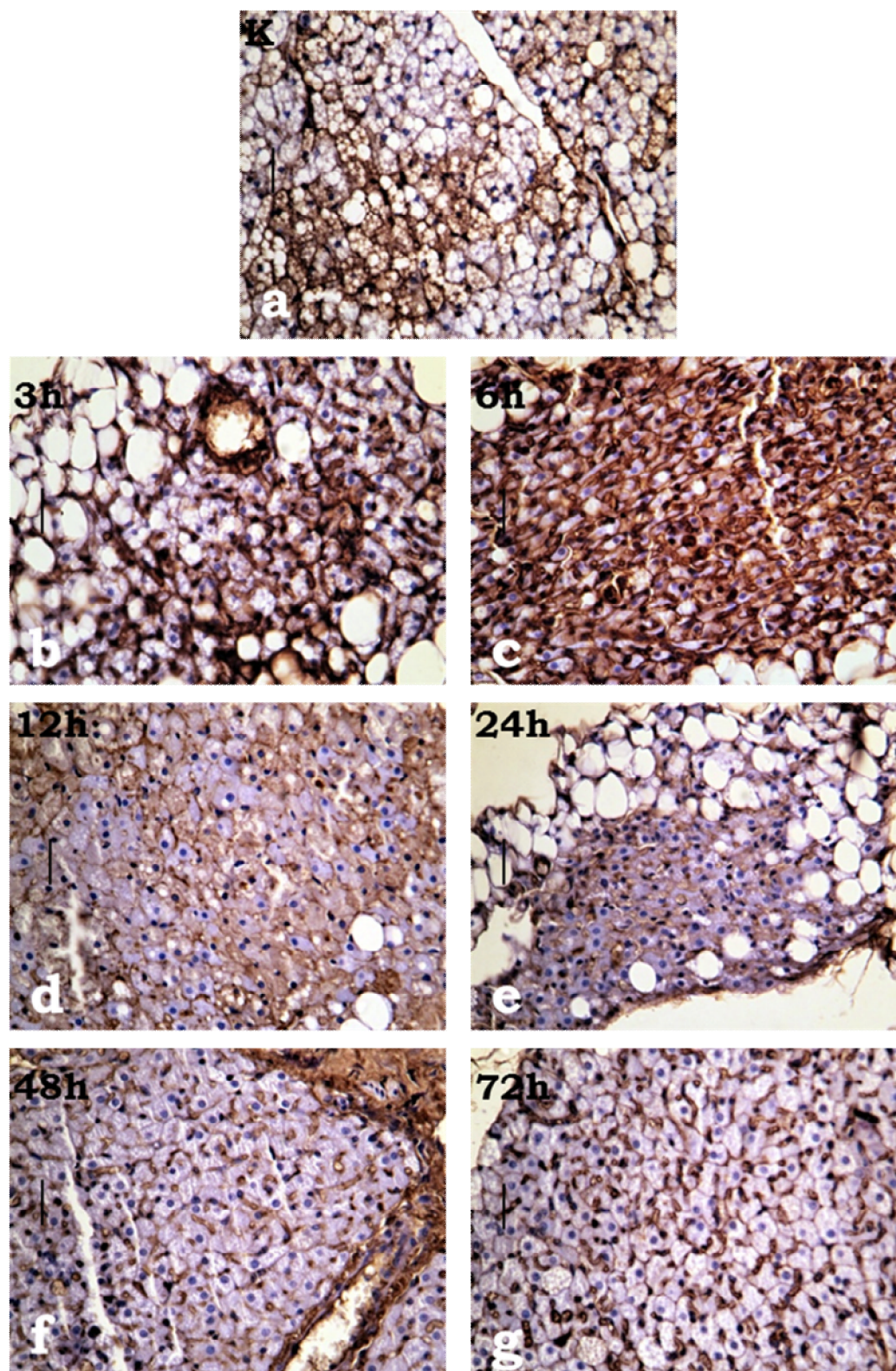
4.1.2.4. Ekspresija Ki-67

4.1.2.4.1. Imunohistohemijska detekcija Ki-67

Slika 23 pokazuje imunohistohemijsku detekciju Ki-67 u BAT. Kao što se vidi, najveći broj mrkih adipocita kontrolne grupe nije pozitivan na Ki-67 za razliku od endotelskih ćelija. Izlaganje hladnoći dovodi do pojačane imunoreakcije u prvim satima (3-6 sati), kada je detektovana reakcija jača u endotelskim ćelijama i vezivno- tkivnoj stromi. Nešto slabija reakcija, iako jača od kontrolne, pokazana je u grupama izlaganim hladnoći u periodu od 12-24 sata kada se reakcija detektuje i u citoplazmi mrkih adipocita. Imunopozitivnost se opet povećava od 48. i 72. sata izlaganja hladnoći najvećim delom u endotelskim ćelijama.



Slika 22. Imunohistohemijska detekcija PCNA u BAT kontrolne grupe (a) i grupa izlaganih hladnoći (b-g). Reprezentativne mikrografije vezivno-tkivne strome (**c-insert**), nukleusa endotelskih ćelija (**e-insert**) i glatkih mišićnih ćelija arteriola pozitivnih na PCNA. Orig. uveličanje: 40x.

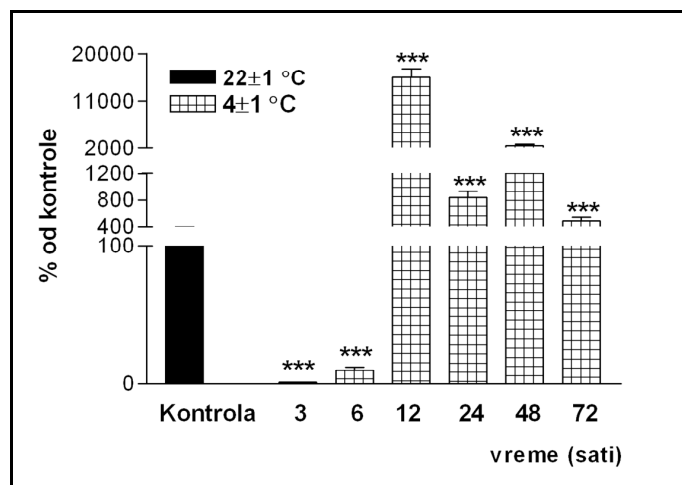


Slika 23. Imunohistohemijska detekcija Ki-67 u BAT kontrolne grupe (a) i grupa izlaganih hladnoći (b-g). Orig. uveličanje: 40x.

4.1.2.5. Ekspresija FABP4 (*engl.* fatty acid binding protein 4)

4.1.2.5.1. Količina Fabp4 iRNK

U odnosu na kontrolnu grupu, nivo transkripta (**Grafik 7**) za Fabp4 se značajno smanjuje kod grupa izlaganih hladnoći 3 i 6 sati ($p < 0.005$), dok se značajno povećanje detektuje u grupama koje su bile izlagane hladnoći 12, 24, 48 i 72 sata ($p < 0.001$).



Grafik 7. Promena količine FABP4 iRNK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.005$.

4.1.2.6. Ekspresija Myf5

4.1.2.6.1. Količina Myf5 iRNK

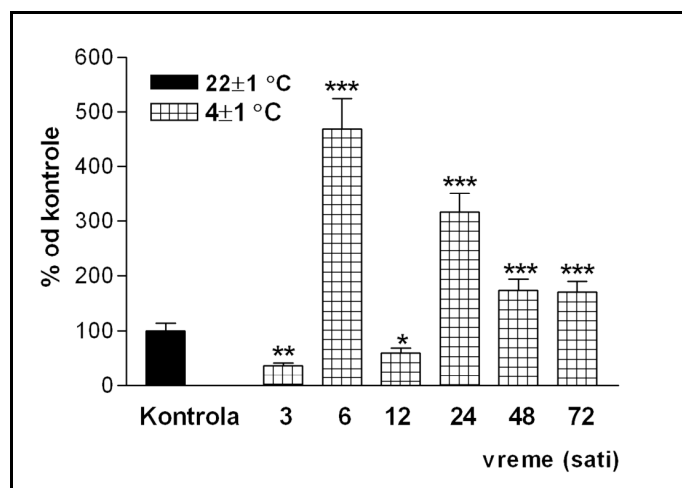
Promene količine Myf5 iRNK prikazane su na **grafiku 8**. Izlaganje pacova hladnoći smanjuje količinu Myf5 iRNK 3. sata ($p < 0.01$) i 12. sata ($p < 0.05$), dok je u ostalim ispitivanim tačkama količina Myf5 značajno povećana u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$).

4.1.2.7. Ekspresija BMP7

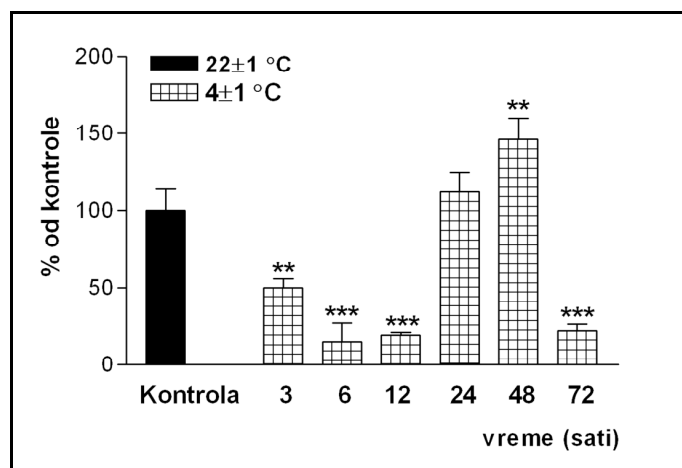
4.1.2.7.1. Količina BMP7 iRNK

U odnosu na kontrolnu grupu, nivo transkripta za BMP7 se značajno smanjuje kod grupa izlaganih hladnoći 3 ($p < 0.01$), 6 i 12 sati

($p < 0.001$), a zatim se povećava dostižući kontrolni nivo 24. sata. Nakon toga nivo transkripta za BMP7 se značajno povećava u grupi izlaganoj hladnoći 48 sati ($p < 0.01$). Značajno smanjenje ($p < 0.001$) se opet detektuje posle 72. sata izlaganja hladnoći (**Grafik 9**).



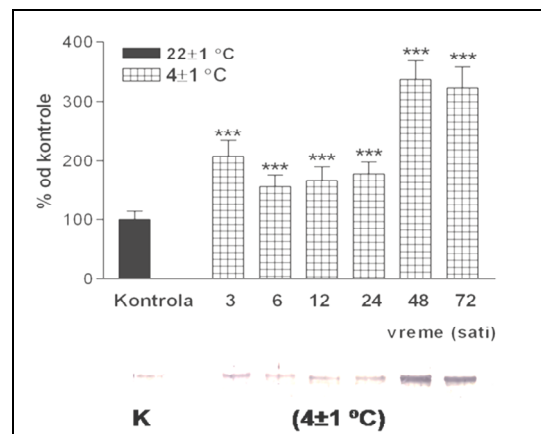
Grafik 8. Promena količine Myf5 iRNAK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.



Grafik 9. Promena količine BMP7 iRNAK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$;

4.1.2.7.2. Količina BMP7 proteina

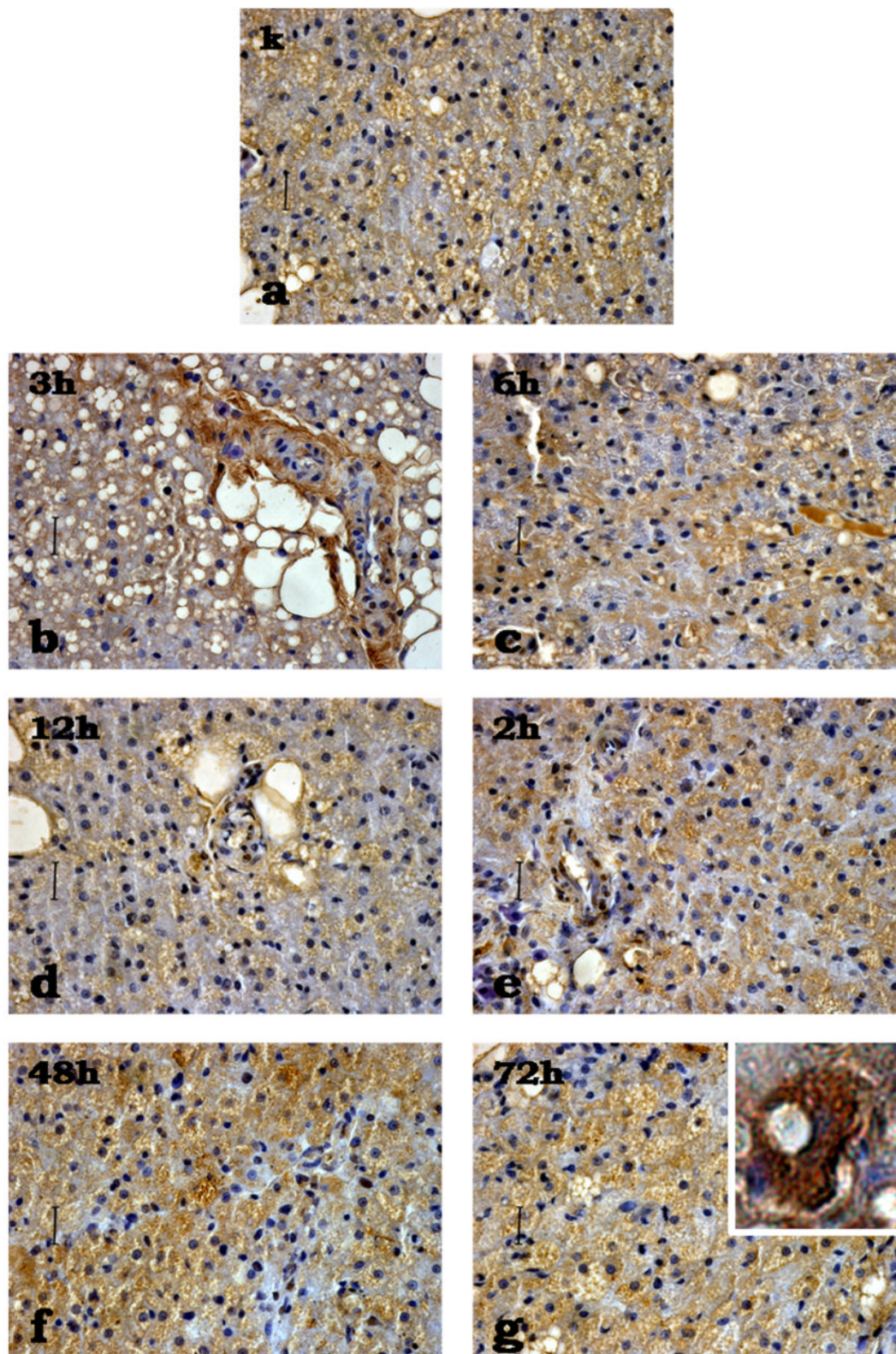
Kod životinja izlaganih hladnoći uočeno je značajno povećanje količine BMP7 proteina u svim eksperimentalnim grupama ($p < 0.001$), u poređenju sa kontrolom (**Slika 24**).



Slika 24. Promena količine BMP7 proteina u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$.

4.1.2.7.3. Imunohistohemijska detekcija BMP7 proteina

Kontrolna grupa pokazala je slabu citoplazmatsku reakciju na BMP7 kako u mrkim adipocitima tako i u citoplazmi endotelskih ćelija. Izlaganje hladnoći tri sata dovelo je do povećanja imunoreakcije, prvenstveno u vezivno-tkivnoj stromi, ali i u citoplazmi mrkih adipocita i preadipocita, posebno u ćelijama adipogeno-angiogenih klastera. Isti obrazac imunoreakcije na BMP7 zapaža se u ostalim ispitivanim tačkama, a najjača reakcija je zabeležena 48. i 72. sata izlaganja hladnoći. Interesantno je da na nivou BAT najjaču pozitivnost pokazuje vezivno-tkivna stroma u svim ispitivanim tačkama (**Slika 25**).

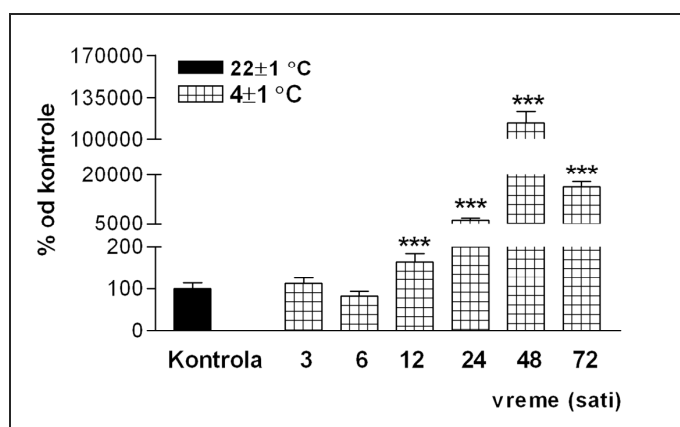


Slika 25. Imunohistohemijska detekcija BMP7 u BAT kontrolne grupe (a) i grupa izlaganih hladnoći (b-g). (Insert) - ekspresija BMP7 u preadipocitu. Orig. uveličanje: 40x.

4.1.2.8. Ekspresija BMP4

4.1.2.8.1. Količina BMP4 iRNK

Promene količine iRNK BMP4 prikazane su na **grafiku 10**. Izlaganje hladnoći tokom prvih šest sati nije dovelo do promena u količini BMP4 iRNK, za razliku od grupa izlaganih 12, 24, 48 i 72 sata, kada je količina iRNK za BMP4 značajno veća u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$).

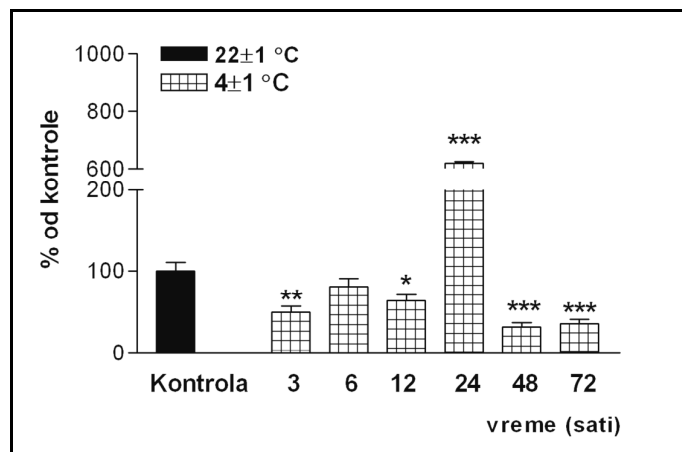


Grafik 10. Promena količine BMP4 iRNK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.005$.

4.1.2.9. Ekspresija KLF9

4.1.2.9.1. Količina KLF9 iRNK

Grafik 11 prikazuje promene količine iRNK za KLF9. Za razliku od grupe koja je izlagana hladnoći 6 sati koja nije pokazala promene, u grupama izlaganim hladnoći 3 sata nivo transkripta je snižen u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$), kao i u grupama izlaganim 12 ($p < 0.05$), 48 i 72 sata izlaganja hladnoći ($p < 0.001$). Samo grupa koja je izlagana hladnoći 24 sata pokazala je povećanu količinu KLF9 iRNK ($p < 0.001$).

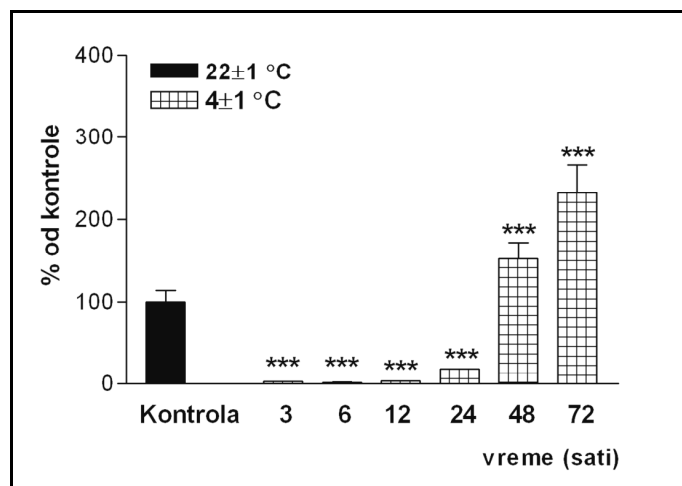


Grafik 11. Promena količine KLF9 iRNK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

4.1.2.10. Ekspresija KLF15

4.1.2.10.1. Količina KLF15 iRNK

U odnosu na kontrolu, životinje izlagane hladnoći od 3.-24. sata pokazuju značajno smanjenje količine KLF15 iRNK ($p < 0.005$). Nakon ovog smanjenja, količina KLF15 iRNK značajno se povećava ($p < 0.005$) u grupama izlaganim hladnoći 48 i 72 sata (**Grafik 12**).



Grafik 12. Promena količine KLF15 iRNK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$.

4.1.2.11. Ultrastrukturalna analiza proliferacije i diferencijacije mrkih adipocita

Za razliku od kontrolne grupe koju karakterišu mrki adipociti sa velikim lipidnim telima i malobrojnim mitohondrijama, grupe izlagane hladnoći pokazuju značajne strukturne promene.

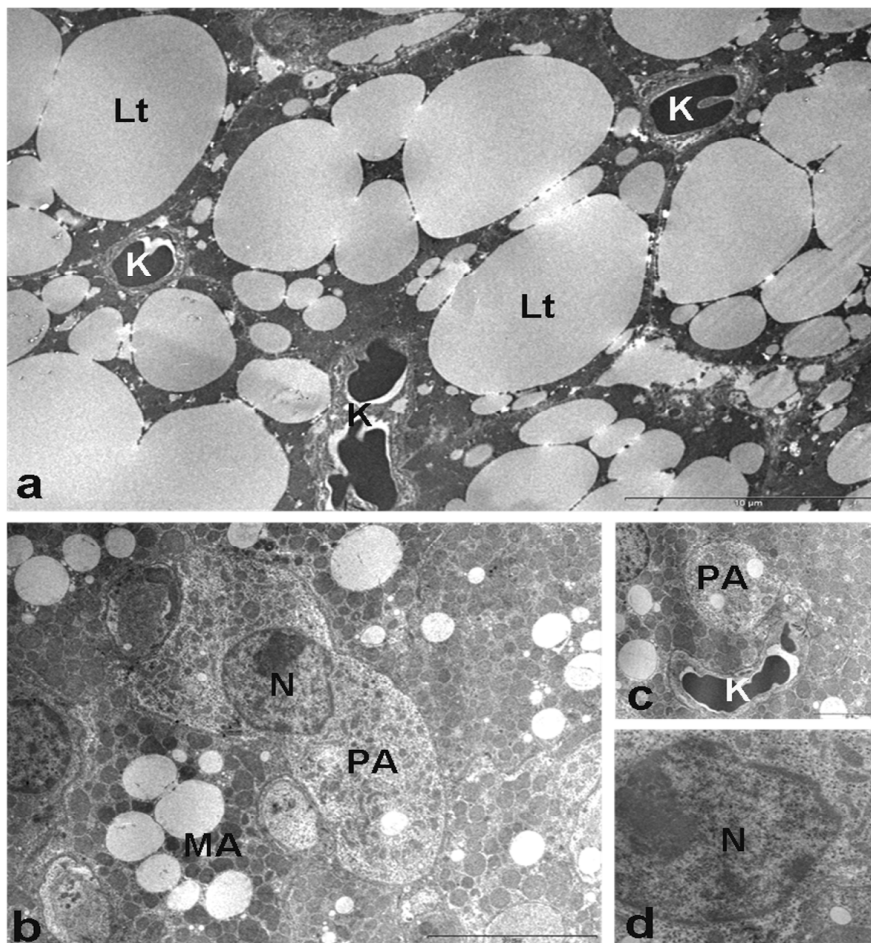
Nakon 3 sata izlaganja hladnoći uočavaju se promene u mrkim adipocitima na nivou lipidnih tela, mitohondrija i nukleusa (**Slika 26**). Lipidna tela postaju sitnija, mitohondrije menjaju oblik ka ovalnom, matriks se prosvetljava a često se uočavaju mitohondrije u procesu deobe. U nukleusima se zapažaju nukleolusi kao i znatan broj interhromatinskih i perihromatinskih granula indikatora intenzivne obrade transkripata.

Na nivou čitavog tkiva hladnoća indukuje povećanje brojnosti preadipocita koji su u kontrolnoj grupi veoma retko viđani. Ove ćelije se lako prepoznaju na nivou TEM po maloj količini svetle citoplazme, malim brojem mitohondrija i lipidnih kapi. Slične promene, ali jačeg intenziteta su zapažene u tkivu grupe koja je izlagana hladnoći 6 sati, sa brojnim znacima sintetske aktivnosti mrkih adipocita i pradipocita, kao što su poliribozomi u citoplazmi i na spoljašnjoj membrani nukleusnog ovoja (**Slika 27**).

Pored intenzivne proliferacije i diferencijacije ćelija u BAT, izlaganje hladnoći dovodi do pojačane inervacije tkiva, pojave brojnih nemijeliniziranih nervnih vlakana uglavnom uz ćelije adipogeno-angiogenih klastera, i formiranja većih nerava gde se uočavaju i mijelinizirani nervni završeci (**Slika 28**).

U svim grupama izlaganim hladnoći evidentno je usitnjavanje lipidnih tela. Ne samo da dolazi do usitnjavanja većih lipidnih tela na manje već i do konverzije unilokulusnih adipocita u multilokulusne. Za razliku od kontrole, gde su ćelije gusto „pakovane“, u svim eksperimentalnim grupama zapaženo je „razmicanje“ ćelija i uvećanje

međucelijskog prostora. U intersticijumu oko adipogeno-angiogenih klastera jasno se uočavaju kolagena vlakna.

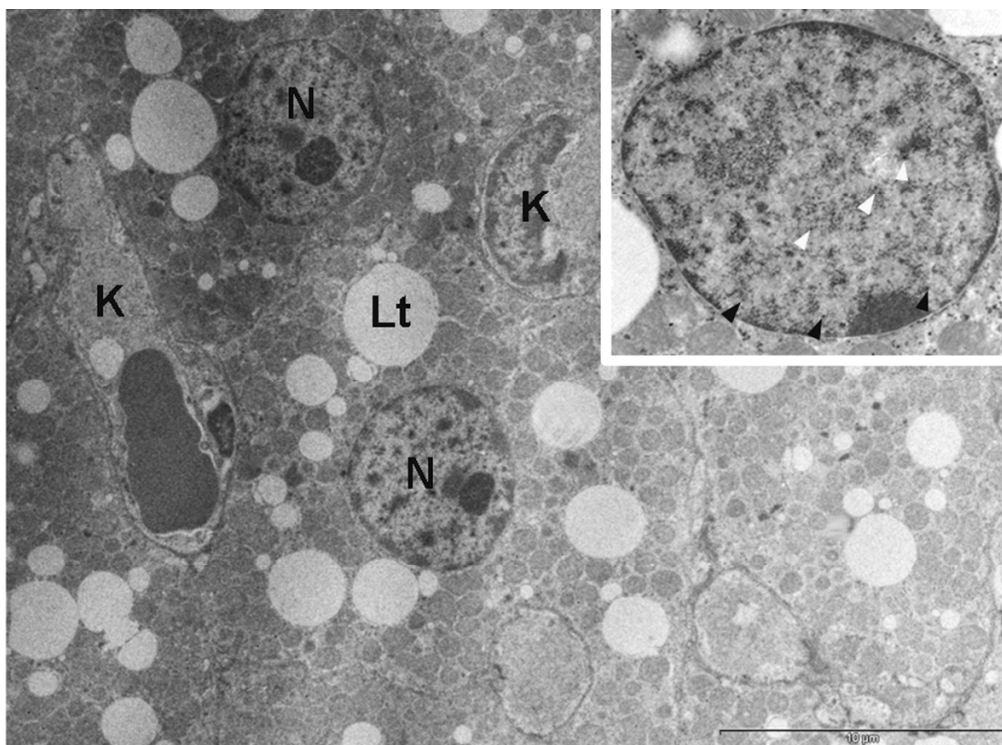


Slika 26. BAT kontrolne (a) i grupe koja je izlagana hladnoći tri sata (b,c,d). U poređenju sa kontrolom, 3 sata izlaganja hladnoći dovodi do promena koje su najizraženije na nivou lipidnih tela (**Lt**), mitohondrija i organela uključenih u sintetske procese. U odnosu na kontrolu, hladnoća u BAT indukuje veću učestalost preadipocita (**PA**), koji su najčešće malog volumena i uglavnom smešteni uz kapilare (**c**). U nukleusima (**N**) mrkih adipocita nukleolus postaje izraženiji ukazujući na povećanu potrebu ćelija za ribozomima (**d**). (**K**) kapilar. Orig. uvećanje: (**a,b**) 2650x; (**c**) 4400x; (**d**) 7100x.

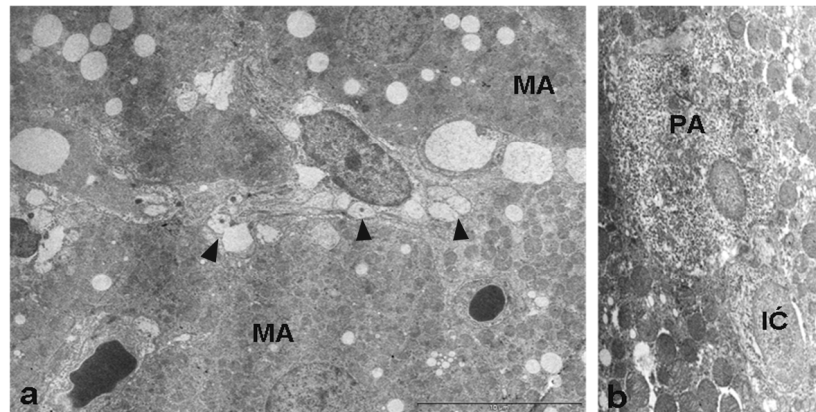
Pojava intersticijskih ćelija i preadipocita je sve više izražena sa dužinom trajanja stimulusa. Na mitotsku sposobnost ovih ćelija ukazuju često prisutne centriole u citoplazmi u grupama izlaganim hladnoći (**Slika 29**). Deobom intersticijske ćelije nastaje jedna intersticijska ćelija i preadipocit, koje su još neko vreme u fizičkom

kontakta. Pored intersticijskih ćelija, sposobnost deobe imaju i preadipociti koji po deobi ostaju jedan pored drugog (**Slika 30**) i ulaze u proces diferencijacije što se manifestuje povećanjem ukupnog volumena ćelije, intenziviranjem mitohondriogeneze i lipogeneze. Preadipociti su najčešće viđani uz kapilare, dok su intersticijske ćelije uočene i pojedinačno.

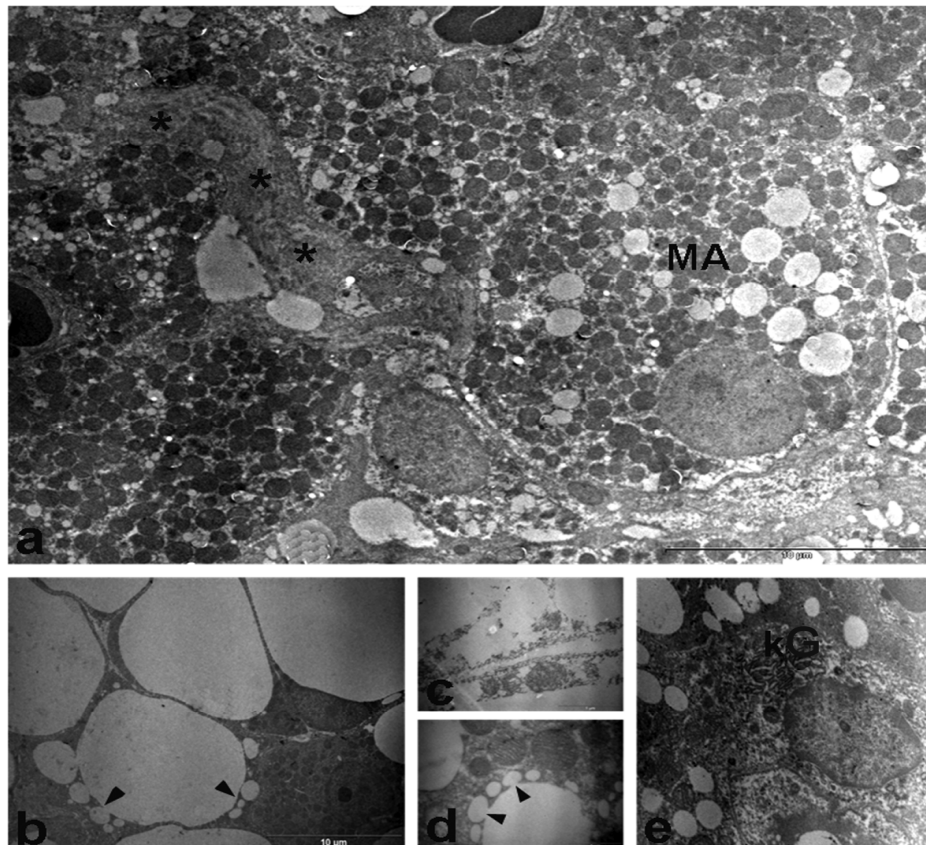
Diferenciranje ćelija je najizraženije u grupi koja je izlagana hladnoći 72 sata i podrazumeva formiranje lipidnih tela u citoplazmi preadipocita kao i deobu mitohondrija. Preadipociti ove grupe imaju veći volumen (**Slika 31**) u odnosu na preadipocite iz drugih eksperimentalnih grupa, a samim tim i veći broj mitohondrija i lipidnih tela. Pored preadipocita, intenzivirana je diferencijacija novonastalih endotelskih ćelija kao i formiranje većih krvnih sudova.



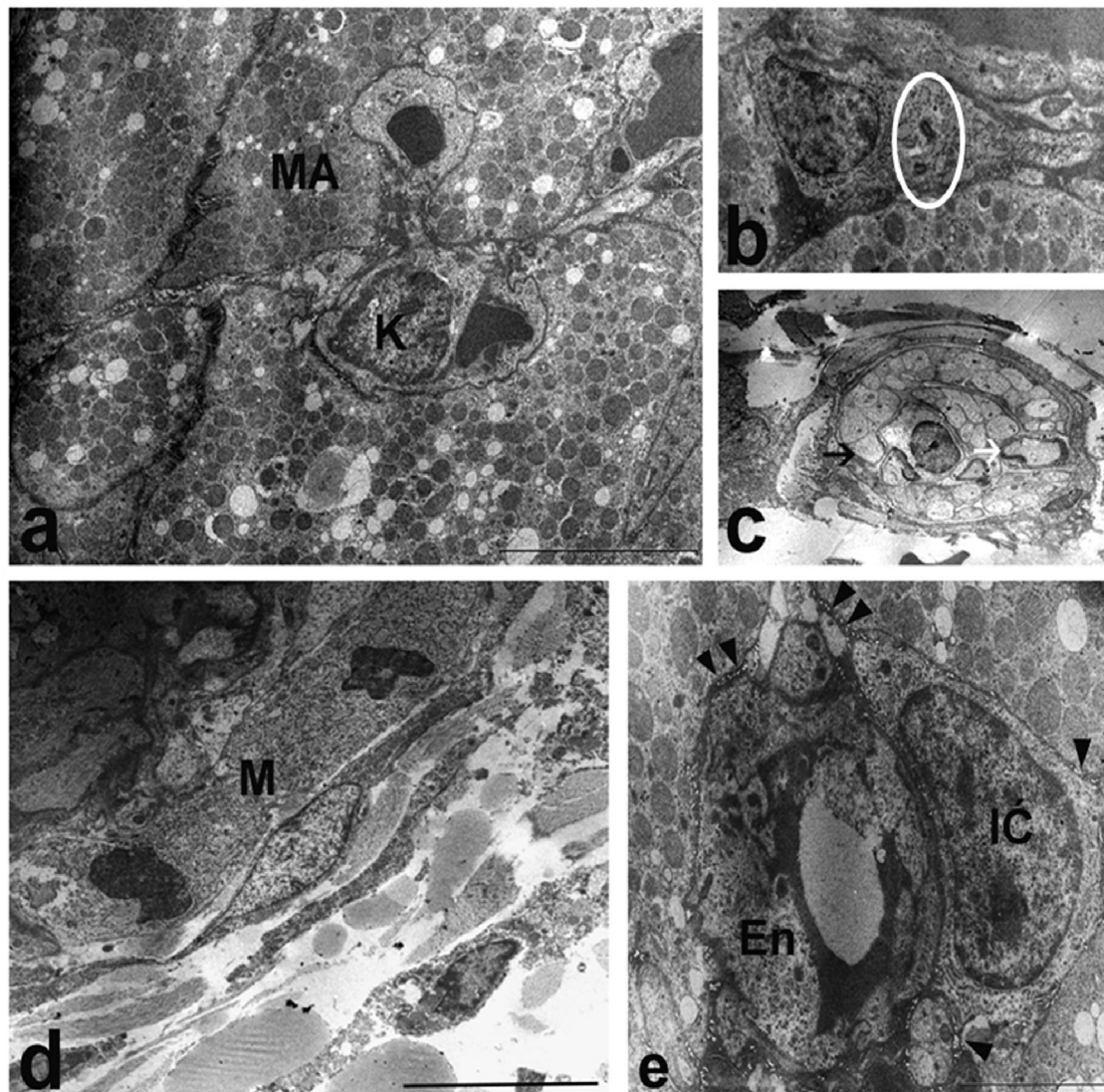
Slika 27. BAT grupe koja je izlagana hladnoći 6 sati. (Insert) – izrazito euhromatski nukleus mrkog adipocita sa brojnim interhromatinskim i perihromatinskim granulama. (**K**) – kapilar, (**N**) – nukleus mrkog adipocita, (**Lt**) – lipidno telo, (Δ) – interhromatinske granule, (\blacktriangleright) – perihromatinske granule. Orig. uveličanje: 2650x; (**insert**) 11500x.



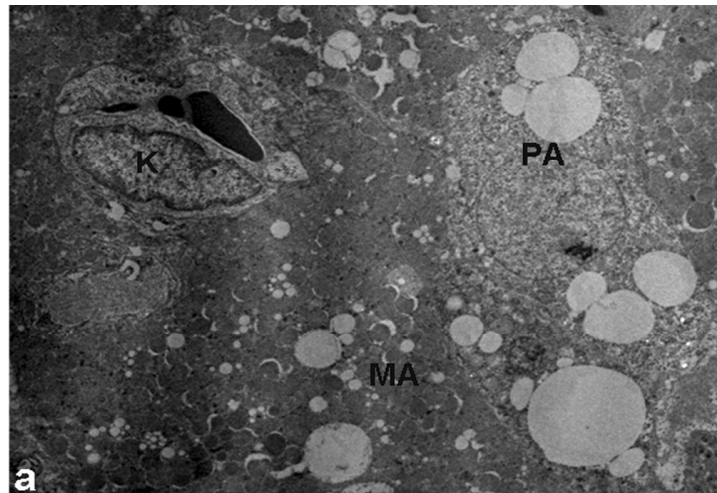
Slika 28. BAT grupe koja je izlagana hladnoći 12 sati (a) – u citoplazmi mrkih adipocita (**MA**) uočavaju se brojne, gusto pakovane mitohondrije i sitna lipidna tela. U vezivno-tkivnoj stromi prisutna su brojna nemijelinizirana nervna vlakna (►). **(b)** Novonastali preadipocit (**PA**) u fizičkom kontaktu sa intersticijskom ćelijom (**IC**). Orig. uveličanje: (a) 2650x, (b) 4400x.



Slika 29. BAT grupe koja je izlagana hladnoći 24 sata. Između mrkih adipocita (**MA**) uočava se uvećanje međucelijskog prostora (*) **(a)**. U tkivu su zapaženi brojni procesi konverzije unilokulusnih adipocita u multilokulusne **(b)**. **(c)** Uvećan detalj usitnjavanja lipidnog tela (►) tokom konverzije unilokulusnog u multilokulusni adipocit. **(d)** Usitnjavanje lipidnih tela je prisutno i u multilokulusnim adipocitima. Veliki broj cisterni kompleksa Goldži (**kG**) u citoplazmi preadipocita ukazuje na povećanu sintetsku aktivnost **(e)**. Orig. uveličanje: **(a,b)** 2650x; **(c)** 31000x; **(d)** 25000x; **(e)** 7100x.



Slika 30. BAT grupe koja je izlagana hladnoći 48 sati. Proliferacija i diferencijacija BAT je praćena intenzivnim remodeliranjem vanćelijskog matriksa: uočava se razrastanje tkiva, širenje međućelijskog prostora kako oko pojedinačnih ćelija tako i oko adipogeno-angiogenih klastera (a). Prisustvo centriola (krug) u citoplazmi intersticijske ćelije ukazuje na mitotičku sposobnost ovih ćelija (b). Izlaganje hladnoći povećava inervaciju pa se uočavaju brojni nervi sa nemijeliniziranim (crna strelica) i mijeliniziranim (bela strelica) nervnim vlaknima (c). Povećana je učestalost deoba preadipocita koji posle deobe ostaju povezani adhezivnim i komunikacijskim vezama (d). Uvećan detalj širenja vanćelijskog matriksa između endotelske i intersticijske ćelije u adipogeno-angiogenom klasteru kao i između klastera i susednih mrkih adipocita. U naizgled „praznim“ prostorima vanćelijskog matriksa (▲) uočavaju se brojna poprečno i uzdužno presečena kolagena vlakna (e). (MA) – mrki adipociti; (K) – kapilar; (En) – endotelska ćelija; (IC) – intersticijska ćelija; (M) – mitoz. Orig. uveličanje: (a,c,d) 2650x; (b,e) 5600x.



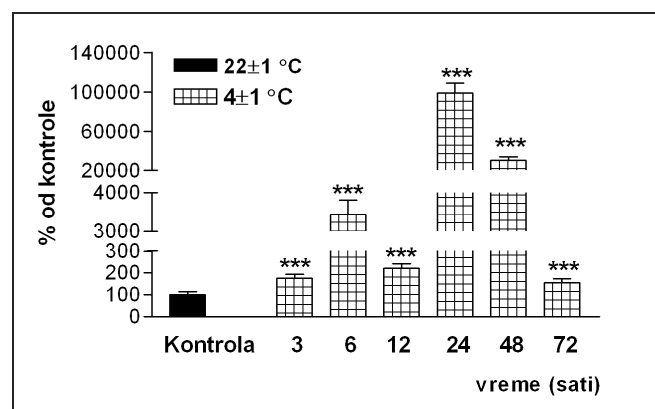
Slika 31. BAT grupe koja je izlagana hladnoći 72 sata. Većina preadipocita (**PA**) ove grupe postepeno dostiže karakteristike zrelih adipocita (**MA**), iako se još uvek razlikuju po svetlijoj citoplazmi, što je posledica manjeg broja mitohondrija u odnosu na potpuno diferencirane ćelije. Orig. uveličanje: 2650x.

4.1.3. Efekat izlaganja hladnoći na angiogenezu u BAT

4.1.3.1. Ekspresija VEGF

4.1.3.1.1. Količina VEGF iRNK

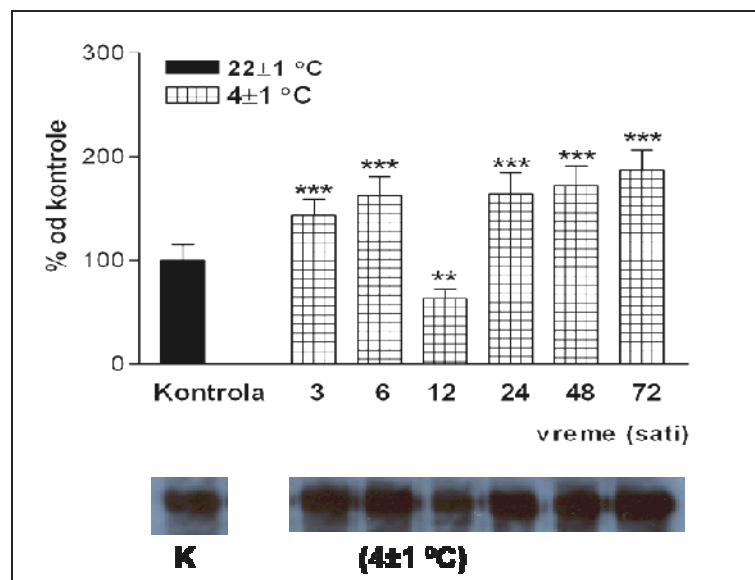
Rezultati prikazani na **grafiku 13** pokazuju da kod svih grupa životinja koje su izlagane hladnoći dolazi do povećanja transkripta za VEGF u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.001$), kao i da je najveća količina transkripta za VEGF detektovana u grupi izlaganoj hladnoći 24 sata.



Grafik 13. Promena količine VEGF iRNK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom; *** $p < 0.001$.

4.1.3.1.2. Količina VEGF proteina

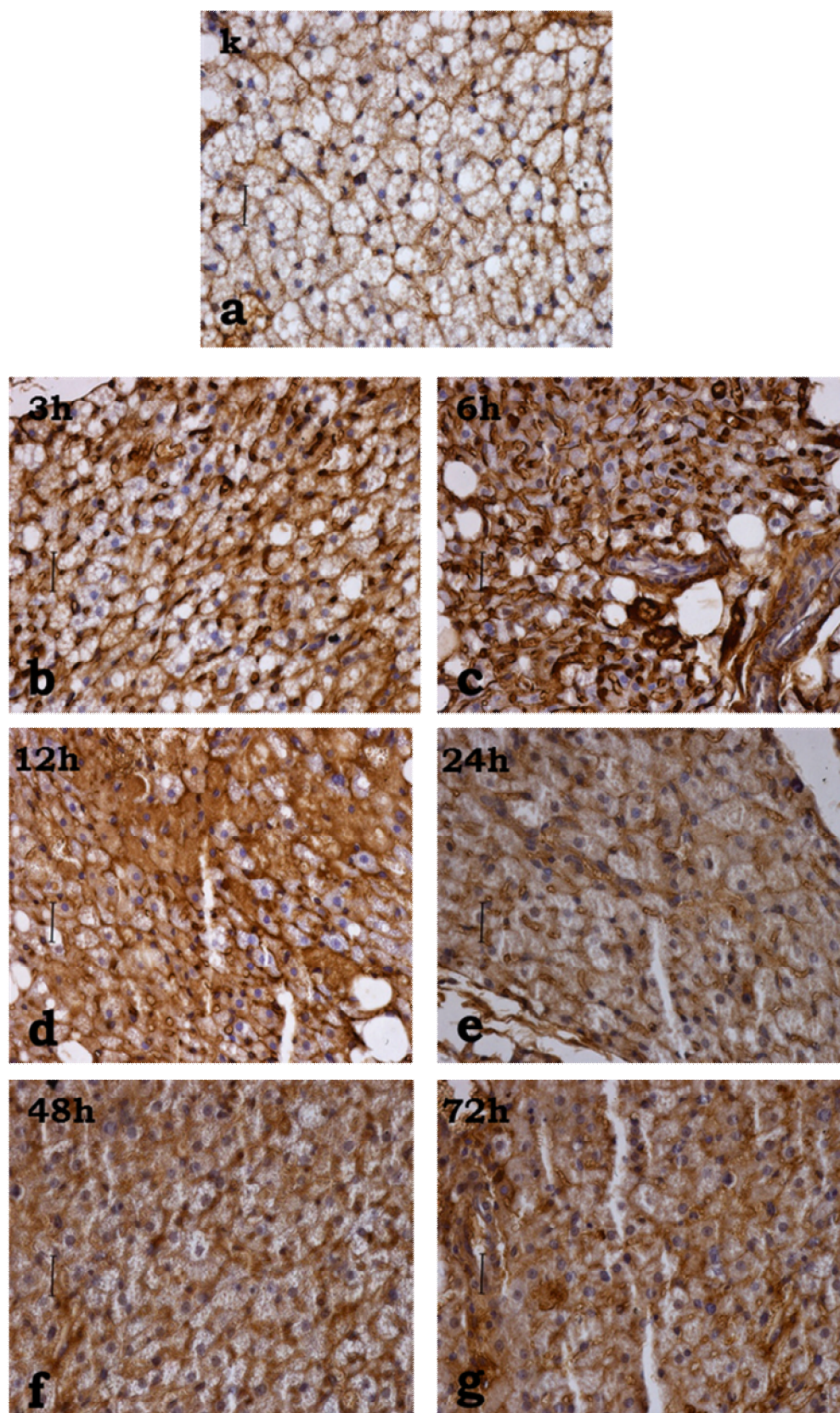
Promene proteinske ekspresije VEGF prikazane su na **slici 32**. Izlaganje hladnoći značajno indukuje ekspresiju VEGF u svim ispitivanim vremenskim tačkama tokom trajanja eksperimenta ($p < 0.005$) osim 12. sata ($p < 0.025$) kada je detektovano smanjenje količine VEGF u poređenju sa kontrolom.



Slika 32. Promena količine VEGF proteina u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

4.1.3.1.3. Imunohistohemijska detekcija VEGF

Rezultati imunohistohemijske detekcije VEGF prikazani su na **Slici 33**. U kontrolnoj grupi je detektovana umerena citoplazmatska reakcija prevashodno endotelskih ćelija. Od 3. sata izlaganja hladnoći pa do kraja ispitivanog perioda imunopozitivnost za VEGF linearno raste i zabeležena je u citoplazmi mrkih adipocita, endotelskih ćelija, preadipocita i vezivno-tkivnoj stromi.

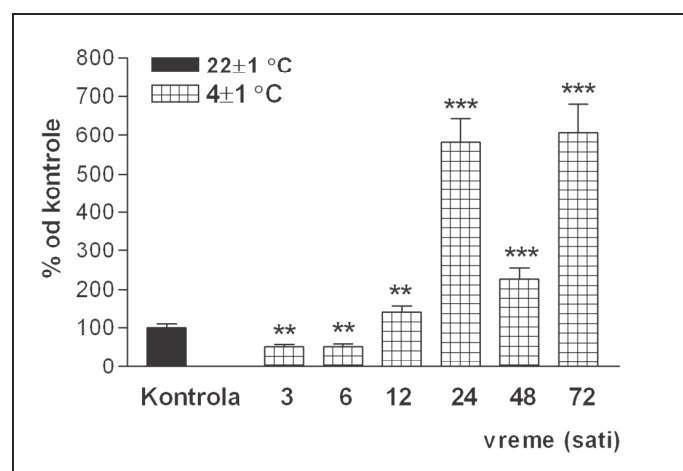


Slika 33. Imunohistohemijska detekcija VEGF u BAT kontrolne grupe (a) i grupa izlaganih hladnoći (b-g). Orig. uveličanje: 40x.

4.1.3.2. Ekspresija endoglina

4.1.3.2.1. Količina iRNK za endoglin

Grafik 14 prikazuje promene količine iRNK za endoglin. Grupe koje su izlagane hladnoći tokom 3, odnosno 6 sati pokazuju značajno smanjenje količine za iRNK endoglin ($p < 0.01$), za razliku od grupe životinja koje su izlagane 12 ($p < 0.01$), 24, 48 i 72 sata kada je detektovano značajno povećanje ($p < 0.001$) u odnosu na kontrolu.



Grafik 14. Promena količine endoglin iRNK u BAT tokom izlaganja hladnoći. *, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

4.1.3.3. Ultrastrukturalna analiza angiogeneze u BAT

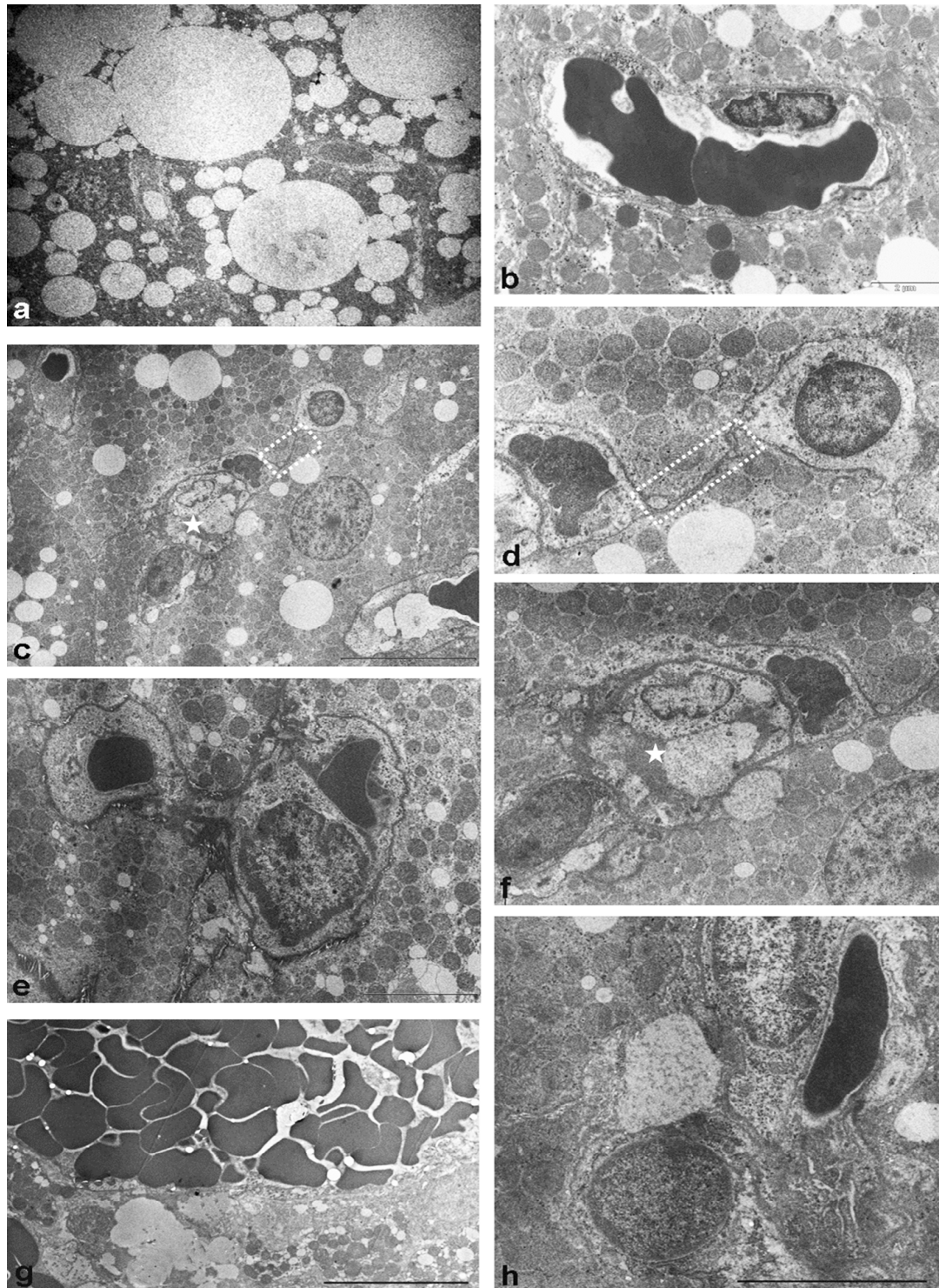
Na nivou TEM kod kontrolne grupe životinja uočava se tipičan izgled endotelskih ćelija sa nukleusom koji zauzima najveći deo citoplazme i manjim brojem organela.

Izlaganje hladnoći u svim grupama dovodi do aktivacije endotelskih ćelija, što se jasno zapaža na osnovu euhromatskih nukleusa, povećanog broja organela uključenih u sintetske procese i pojavom tamnih granula u citoplazmi. Pored toga, izražena je pojava adipogeno-angiogenih klastera što je praćeno promenama u vanćelijskom matriksu, koji se uvećava i formira mesto za novonastale

ćelije koje će krenuti u proces diferencijacije. Kako odmiče proces diferencijacije, ćelije adipogeno-angiogenog klastera se postepeno razdvajaju ali i dalje ostaju u kontaktu brojnim međućelijskim vezama, što se jasno uočava na nivou TEM (**Slika 34**).

U prvim satima (3. sat) izlaganja hladnoći dominantan je efekat aktivacije endotelskih ćelija, što će omogućiti dalje promene vaskularne mreže: formiranje kapilarnih „izdanaka“ i mitozu endotelskih ćelija. Ukoliko uporedimo ova dva fenomena uočava se da tokom izlaganja hladnoći prvo dolazi do vazodilatacije i povećanja kontaktne površine između kapilara i mrkih adipocita u grupama koje su izlagane hladnoći, u cilju obezbeđivanja povećanog protoka krvi kroz tkivo i veličine lumena krvnih sudova, a zatim i do formiranja novih kapilara.

Kao prateći proces dilatacije i razvoja kapilara veoma je izražena ekstravazacija eritrocita vidljiva na nivou svetlosne i transmisione elektronske mikroskopije, počev od 12. sata izlaganja hladnoći a najizraženija je u grupi koja je izlagana hladnoći 24 sata. Pored toga što broj aktiviranih endotelskih ćelija i kapilarnih izdanaka raste sa dužinom izlaganja hladnoći, grupe izlagane 48 i 72 sata pokazuju i najveću učestalost deoba endotelskih ćelija.



Slika 34. Angiogeneza u BAT tokom hladnoćom indukovane hiperplazije. (a) kontrola; (b-h) grupe izlagane hladnoći. Prvi odgovor tkiva na izlaganje hladnoći je vazodilatacija (b,g) a zatim angiogeneza kapilara, praćena učestalom pojavom adipogeno-angiogenih klastera (c,d,e,f). Endotelske ćelije i prekursori mrkih adipocita su u fizičkom kontaktu (d). Adipogeno-angiogeni klaster (zvezdica); međućelijska komunikacija (region isprekidane linije). Izlaganje hladnoći dovodi do aktivacije endotelskih ćelija i pojave organela uključenih u sintetske procese (h). Orig. uveličanje: (a,c,g) 2650x, (b,e,f,h) 4400x; (d) 5600x.

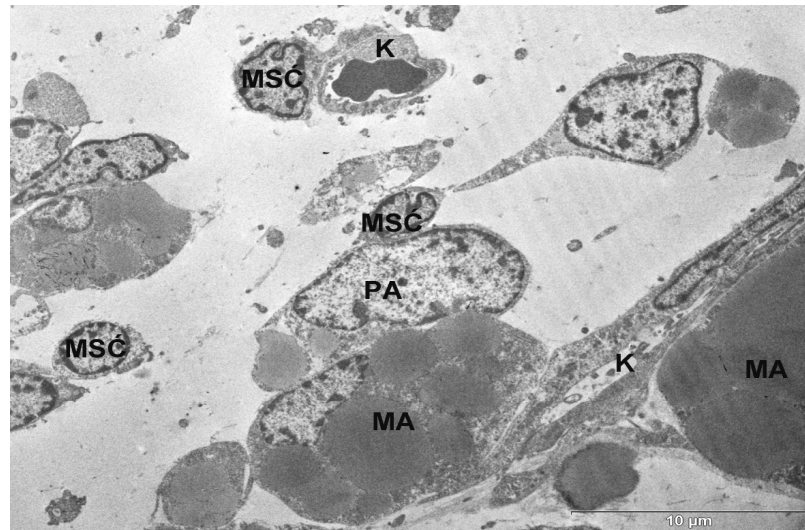
4.2. RAZVOJ HUMANOG FETALNOG BAT

4.2.1. Ultrastrukturna analiza humanog fBAT

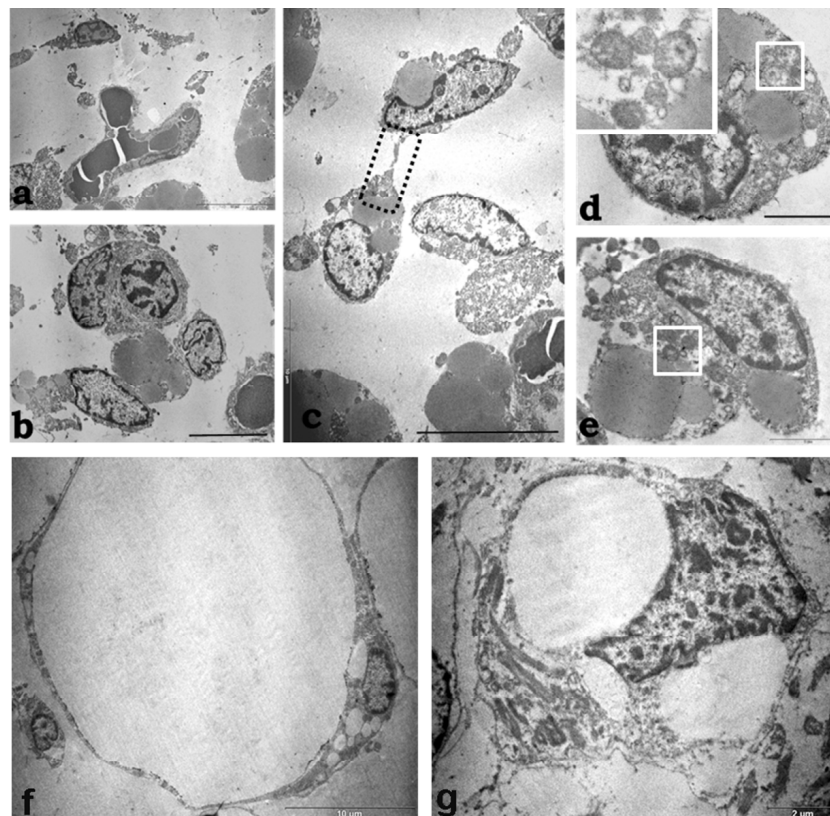
Ultrastrukturna analiza je pokazala da humano fBAT čine najvećim delom diferencirani mrki adipociti, brojne prekursorske ćelije u različitim fazama diferencijacije kao i brojni kapilari (**Slika 35**).

Pored toga, uočeno je da su mezenhimske stem ćelije i preadipociti pozicionirani uglavnom u blizini kapilara (**Slika 36**) i da formiraju adipogeno-angiogene klastere. Prekursorske ćelije međusobno ostvaruju brojne međućelijske komunikacije, kao i komunikacije sa endotelskim ćelijama. Preadipociti, ćelije koje se lako prepoznaju po početnom nakupljanjem lipidnih tela, poseduju veći broj organela u citoplazmi u odnosu na mezenhimske stem ćelije, kao i brojne glikogenske partikule. Najveći broj mitohondrija u citoplazmi preadipocita nema kriste. Ultrastrukturna analiza preseka je pokazala brojne unilokulusne ćelije u kojima se vidi usitnjavanje jednog velikog lipidnog tela. U pojedinim preadipocitima se u citoplazmi pored lipidnih tela uočavaju i citoskeletni elementi paralelne organizacije koji izgledom podsećaju na sarkomere.

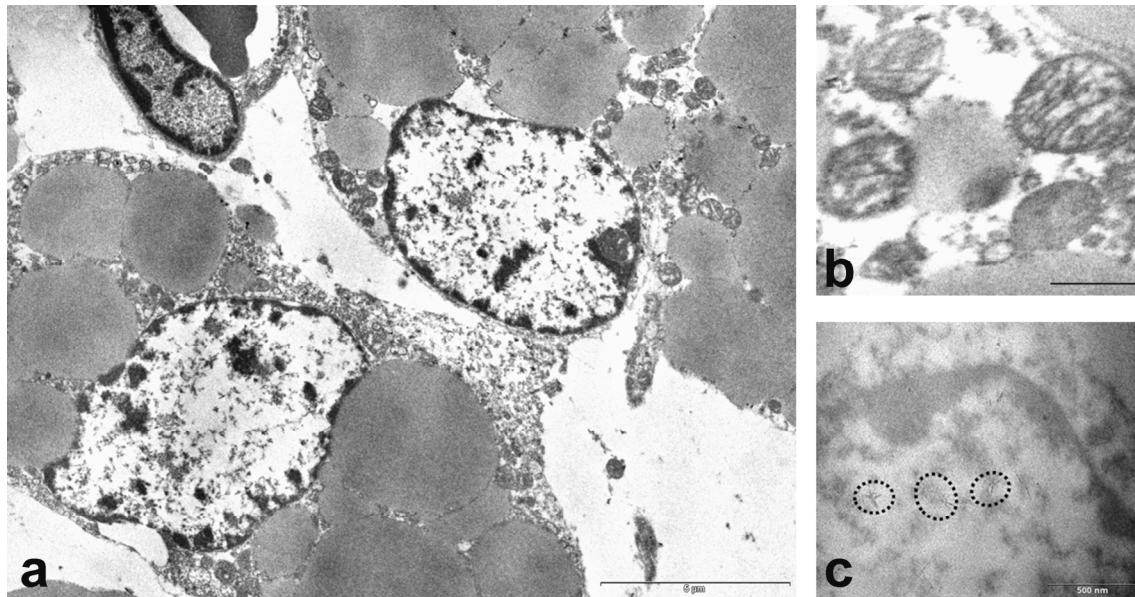
Multilokulusne, diferencirane mrke adipocite humanog fBAT (**Slika 37**) karakterišu sve ultrastrukturne odlike adultnih adipocita BAT: veći broj krupnih lipidnih tela, okrugao, euhromatski nukleus sa izraženim nukleolusom (nekada i dva) i brojne okrugle mitohondrije sa paralelno pakovanim kristama. Često se u nukleusima mrkih adipocita zapažaju perihromatinski fibrili, dokaz intenzivne obrade iRNK transkripata.



Slika 35. Ultrastruktura humanog fBAT. (MA) – mrki adipocit, (PA) –preadipocit, (K) – kapilar, (MSC) – mezenhimska stem ćelija. Orig. uveličanje: 2650x.

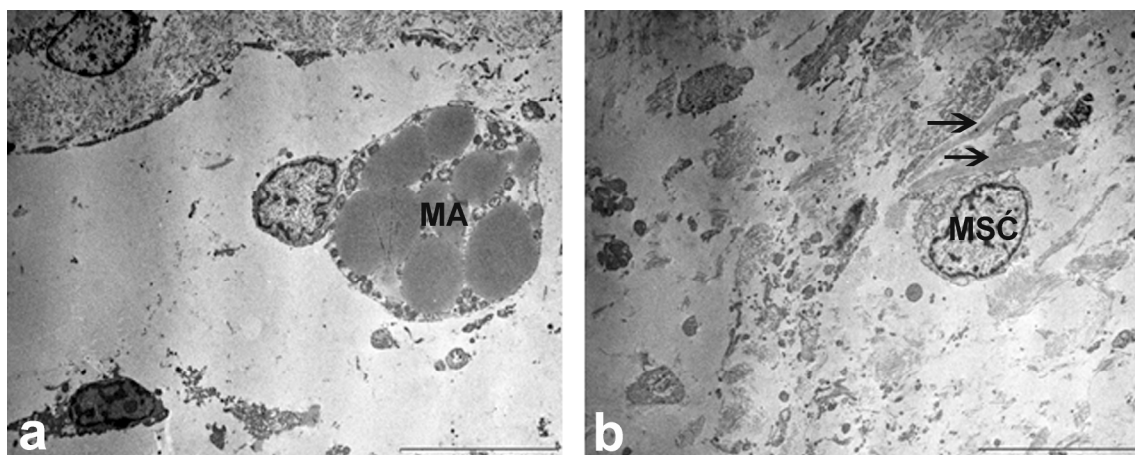


Slika 36. Prekursorske ćelije humanog fBAT. Preadipociti su najčešće pozicionirani uz kapilare (a) formirajući adipogeno-angiogene klaster (b) u kojima se vidi da su ove ćelije u fizičkom kontaktu (c). Najveći broj mitohondrija preadipocita nemaju kriste (d,e). Unilokulusni mrki adipocit (f) i sarkomerama-slično organizovan citoskelet u preadipocitima (g). Region isprekidane linije prikazuje fizički kontakt dva preadipocita dok regioni uokvireni punom linijom prikazuju mitohondrije. Orig. uveličanje: (a) 3400x; (b) 4400x; (c) 2650x; (d,e) 11500x; (g) 7100x.



Slika 37. Mrki adipocit humanog fBAT. (a) Multilokulusni, diferencirani mrki adipociti humanog fBAT karakterišu sve ultrastrukturne odlike adultnih adipocita: veći broj krupnih lipidnih tela, okrugao, euhromatski nukleus sa izraženim nukleolusom (nekada i dva) i brojne okrugle mitohondrije sa paralelno pakovanim kristama (b). U nukleusima se zapažaju brojni perihromatinski fibrili (isprekidane linije), pokazatelji intenzivne obrade transkripata. Orig. uvećanje: (a) 2650x; (b) 11500x; (c) 31000x.

Pored nabrojanih ćelija u humanom fBAT, uočava se prosvetljen, uvećan međucelijski prostor u kome se oko ćelija zapažaju kolagena vlakna (Slika 38).



Slika 38. Vanćelijski matriks u humanom fBAT. Mrki adipocit (MA) i mezenhimska stem ćelija (MSC) u "niši" vanćelijskog matriksa okruženi brojnim kolagenim vlaknima (strelica). Orig. uvećanje: (a,b) 2650x.

4.2.2. Termogeni kapacitet humanog fBAT

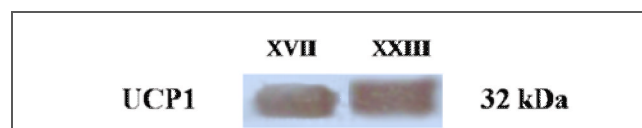
4.2.2.1. Imunohistohemijska detekcija UCP1

Na **slici 40** prikazana je imunohistohemijska detekcija UCP1 u humanom fBAT. U ovom periodu BAT se sastoji od brojnih manjih i većih lobusa, koji su jasno odvojeni vezivno-tkivnom stromom. Oko BAT uočava se poprečno-prugasta muskulatura a na periferiji lobusa dominiraju krupni, unilokulusni adipociti, dok su multilokulusni adipociti pozicionirani najvećim delom u središtu lobusa.

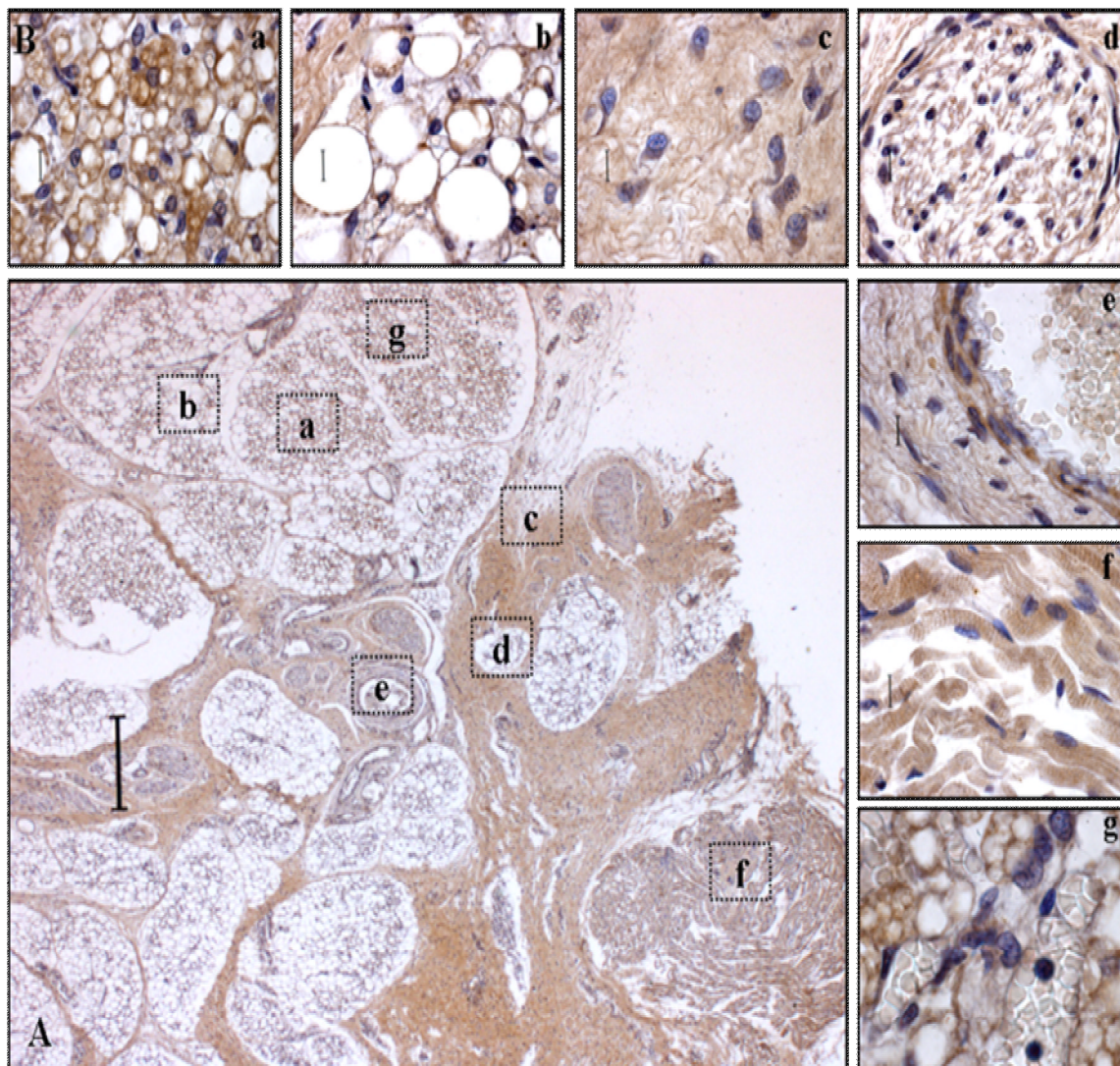
Na većem uveličanju jasno se detektuje jaka UCP1 imunopozitivnost kako u zrelih multilokulusnim, tako i u unilokulusnim adipocitima. Reakcija je uočena u citoplazmi, ali i brojnim nukleusima ovih ćelija. Pored toga, jaka reakcija je prisutna u vezivno-tkivnoj stromi humanog fBAT i malim lobusima u procesu formiranja. Endotelske ćelije uglavnom većih krvnih sudova su pokazale imunoreaktivnost za UCP1 za razliku od endotelskih ćelija manjih krvnih sudova, kod kojih reakcija uglavnom nije detektovana. Takođe, imunopozitivnost je prisutna u citoplazmi poprečno-prugastih mišićnih ćelija.

4.2.2.2. Količina proteina UCP1

Promene proteinske ekspresije UCP1 su prikazane na **slici 39**. U poređenju sa XVII nedeljom, količina proteina UCP1 je veća u XXIII nedelji fetalnog razvoja.



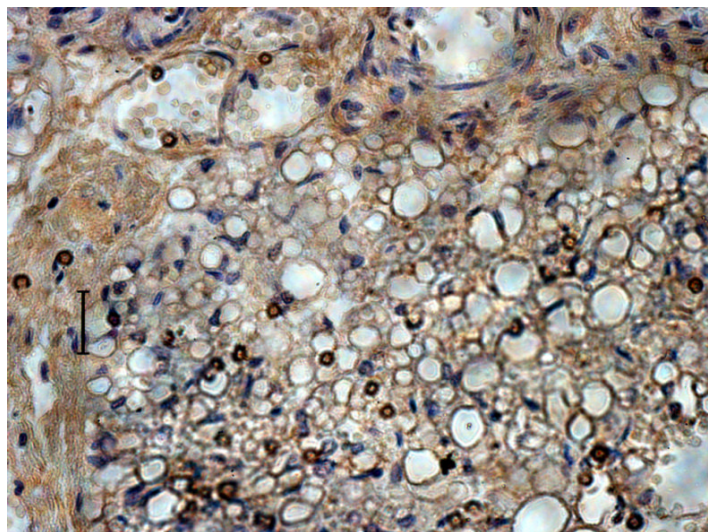
Slika 39. Količina UCP1 u humanom fBAT.



Slika 40. Imunohistohemijaska detekcija UCP1 u humanom fBAT. UCP1 je lokalizovan u (a) multilokulusnim mrkim adipocitima, (b) unilokulusnim adipocitima, (c) vezivno-tkivnoj stromi, endotelskim ćelijama većih krvnih sudova (e) kao i u citoplazmi poprečno-prugastih mišićnih ćelija (f). Endotelske ćelije manjih krvnih sudova nisu pokazale reakciju (g). Orig. uveličanje: (A) 10x (B) 40x.

4.2.2.3. Imunohistohemijaska detekcija noradrenalina

Kao što se vidi na **slici 41**, noradrenalin je detektovan u citoplazmi mrkih adipocita humanog fBAT i nervnim završecima, u kojima je reakcija najviše izražena.



Slika 41. Imunohistochemijska detekcija noradrenalina u humanom fBAT. Orig. uveličanje: 40x.

4.2.3. Regulatori diferencijacije i mitohondriogeneze humanog fBAT

4.2.3.1. Količina proteina PPAR γ

Promene proteinske ekspresije su prikazane na **slici 42**. U poređenju sa XVII nedeljom, količina proteina PPAR γ je veća u XXIII fetalnog razvoja.



Slika 42. Količina PPAR γ u humanom fBAT.

4.2.3.2. Količina proteina PGC-1 α

Promene proteinske ekspresije PGC-1 α su prikazane na **slici 43**. U poređenju sa XVII nedeljom, količina proteina PGC-1 α je veća u XXIII nedelji fetalnog razvoja.



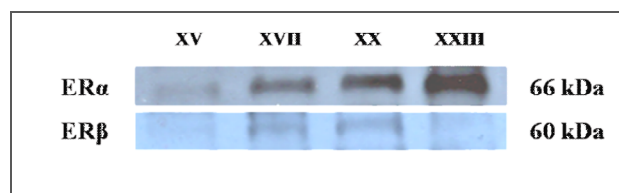
Slika 43. Količina PGC-1 α u humanom fBAT.

4.2.4. Regulatori strukturnog i funkcijskog razvoja humanog fBAT

4.2.4.1. Estrogenski receptori

4.2.4.1.1. Količina proteina ER α i ER β

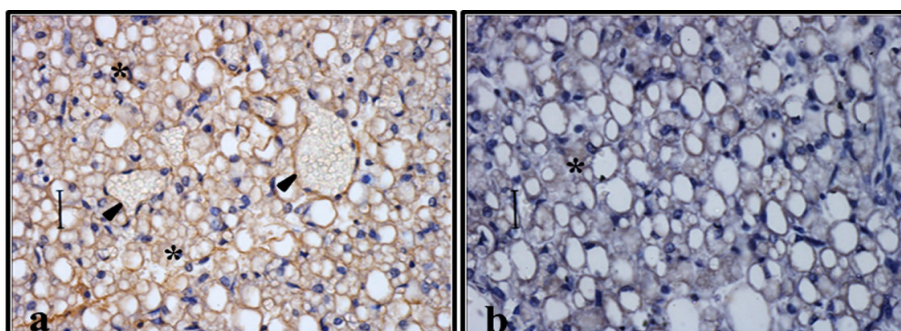
Vremenski zavisne promene količine ER α prikazane su na **slici 44**. Kao što se vidi, količina ER α progresivno raste počev od XVII do XXIII nedelje fetalnog razvoja. U istom periodu, količina ER β je manja u poređenju sa količinom ER α . Šta više, ER β protein nije detektovan Western blot analizom u XVII i XXIII nedelji razvoja humanog fBAT.



Slika 44. Količina ER α i ER β u humanom fBAT.

4.2.4.1.2. Imunohistohemijska detekcija ER α i ER β

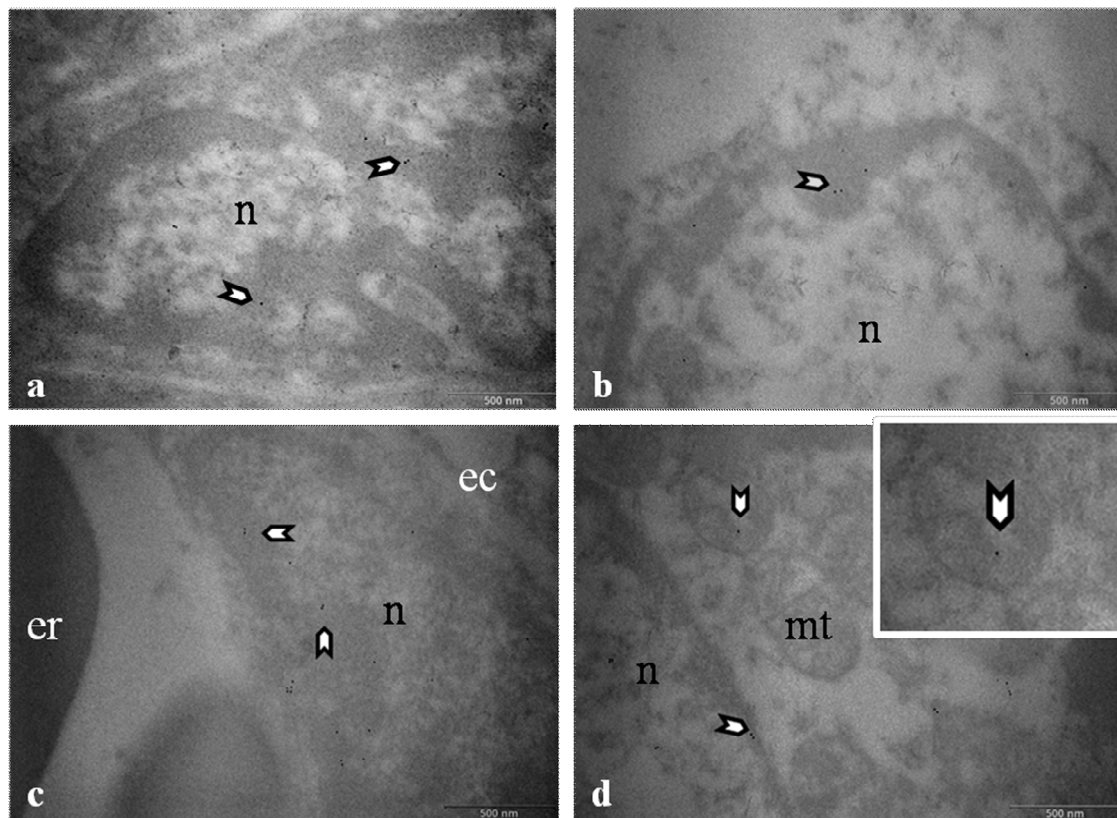
Rezultati imunohistohemijske detekcije ER α i ER β su prikazani na **slici 45**. Jaka citoplazmatska imunopozitivnost i nukleusna lokalizacija ER α zabeležena je u mrkim adipocitima kao i u endotelskim ćelijama. Vezivno-tkivna stroma humanog fBAT je takođe pokazala imunopozitivnost dok je reakcija za ER β prisutna samo u zrelim, multilokulusnim adipocitima i ocenjena je kao slaba.



Slika 45. Imunohistohemijska detekcija ER α i ER β u humanom fBAT. Endotelska ćelija (strelica) i mrki adipocit (zvezdica). Orig. uveličanje (a,b): 40x.

4.2.4.1.3. Imunocitohemijska detekcija ER α i ER β

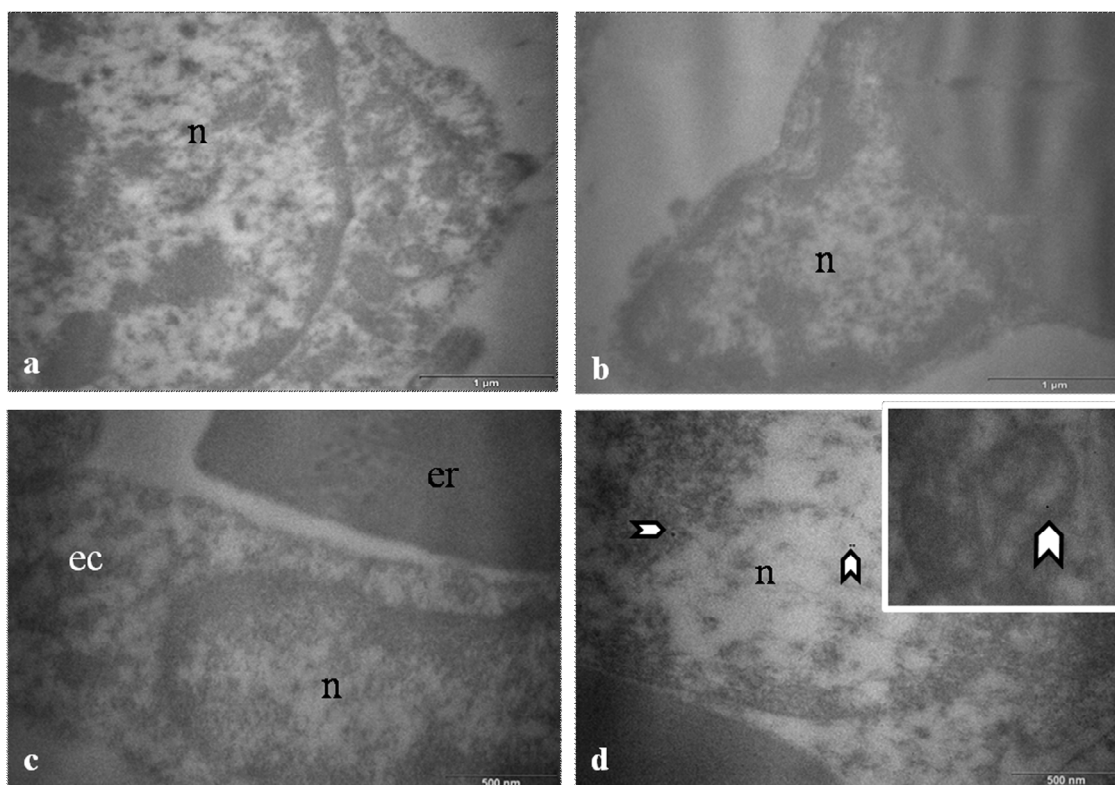
Rezultati imunocitohemijske analize za ER α u humanom fBAT su prikazani na **slici 46**. Prisustvo imunogold partikula je zapaženo u citoplazmi i nukleusima zrelih mrkih adipocita, endotelskih ćelija, preadipocitima i mezenhimskim stem ćelijama.



Slika 46. Imunocitohemijska detekcija ER α u humanom fBAT. Imunogold partikule su detektovane u mezenhimskim stem ćelijama (**a**), preadipocitima (**b**), endotelskim ćelijama (**c**) i zrelim mrkim adipocitima (**d**). (**n**) nukleus; (**en**) endotelska ćelija; (**er**) eritrocit; (**mt**) mitohondrija. Bar: 500 μ m.

Rezultati imunocitohemijske analize za ER β u humanom fBAT su prikazani na **slici 47**. Za razliku od ER α , ER β -imunogold partikule su detektovane samo u zrelim mrkim adipocitima, u nukleusu i u citoplazmi. Obe izoforme estrogenih receptora su prisutne u nivou ćelijske membrane kao i u mitohondrijama mrkih adipocita (**Slika 46, 47d-insert**). Pored toga, partikule prisutne u nukleusu mrkih adipocita

su češće zapažane u euhromatskim oblastima nukleusa. Rezultati imunocitohemijske analize su objedinjeni u **Tabeli 4.**



Slika 47. Imunocitohemijska detekcija ER β u humanom fBAT. Imunogold partikule nisu detektovane u mezenhimskim stem ćelijama (a), preadipocitima (b) i endotelskim ćelijama (c) ali je pokazano njihovo prisustvo u zrelih mrkim adipocitima (d). (n) nukleus; (en) endotelska ćelija; (er) eritrocit; (mt) mitohondrija. Bar: (a,b) 1 μ m, (c,d) 500nm.

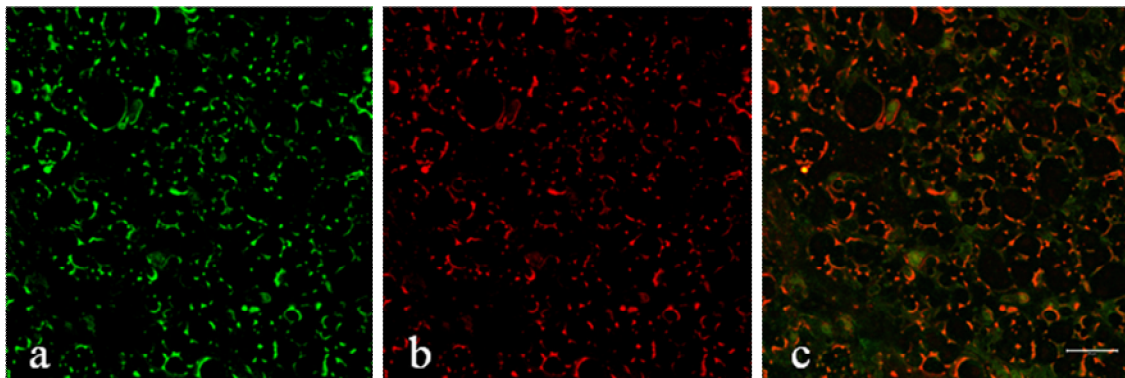
Tabela 4. Imunocitohemijska lokalizacija ER α i ER β u humanom fBAT.

	ER alfa	ER beta
Mezenhimiska stem ćelija	+	-
Endotelska ćelija	+	-
Preadipocit	+	-
Mrki adipocit	+ (ĆM, C, N, Mt)	+ (ĆM, C, N, Mt)

+ partikule prisutne, - partikule nisu prisutne, ĆM ćelijska membrana, C citoplazma, N nukleus, Mt mitohondrija

4.2.4.1.4. Kolokalizacija ER α i ER β

Na **slici 48** prikazani su rezultati fluorescentne imunohistohemijske detekcije ER α i ER β kao i kolokalizacija ova dva proteina. Analizom preseka uočena je slaba kolokalizacija između ER α i ER β . Kolokalizacija ER je zapažena u pojedinim nukleusima i citoplazmi zrelih mrkih adipocita. Izračunavanje Pearsonovog koeficijenta je povrdilo naša zapažanja, pokazujući da je vrednost koeficijenta ispod 0.5 (0.29 ± 0.0023).



Slika 48. Imunofluorescentna kolokalizacija ER α i ER β u humanom fBAT. Fluorescentno obeleženi ER α (a), ER β (b), kao i njihova kolokalizacija (c).

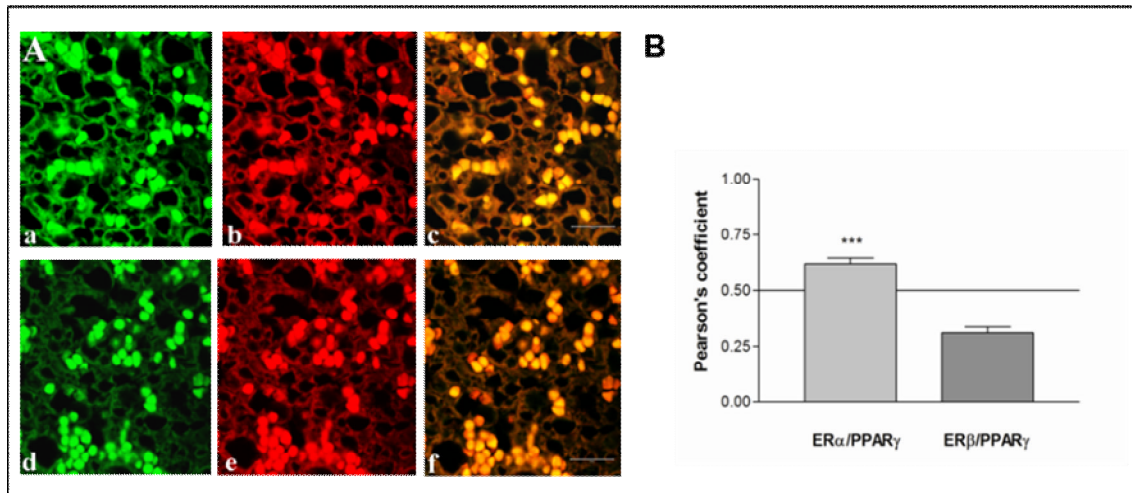
4.2.4.1.5. Kolokalizacija ER i PPAR γ

Pearsonov koeficijent korelacije (**Slika 49**) pokazao je da postoji značajna kolokalizacija između ER α i PPAR γ (0.58 ± 0.07), za razliku od vrednosti kolokalizacije izračunate za ER β i PPAR γ (0.32 ± 0.03) koja se ne smatra značajnom. Pored toga, Studentovim t testom pokazana je značajna razlika između srednjih vrednosti kolokalizacije za ER α -PPAR γ i za ER β -PPAR γ ($p < 0.005$).

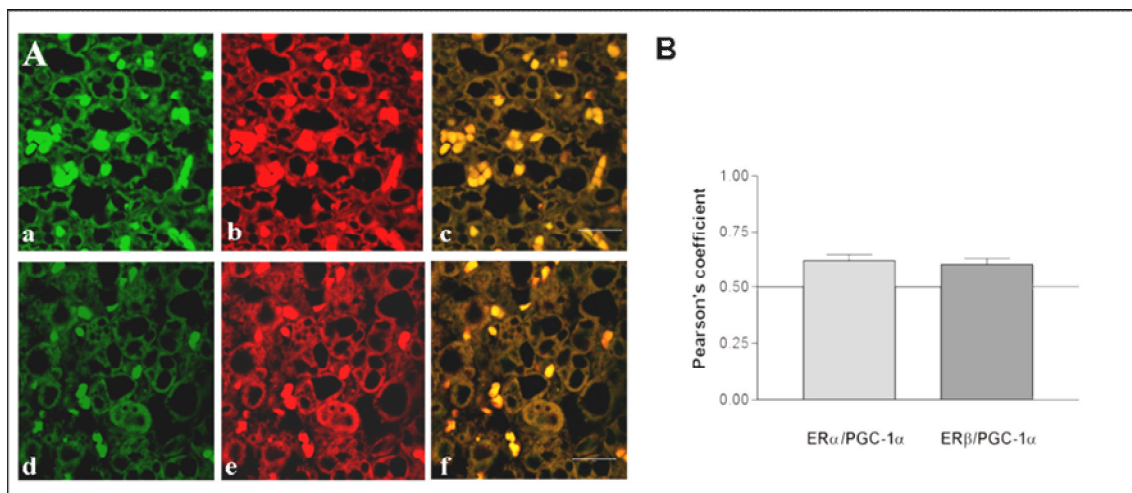
4.2.4.1.6. Kolokalizacija ER i PGC-1 α

Vrednost Pearsonovog koeficijenta korelacije pokazala je značajan stepen kolokalizacije između ER α i PGC-1 α (0.62 ± 0.04) kao i između

ER β i PGC-1 α (0.60 ± 0.03) (**Slika 50**). Studentov t-test nije pokazao razliku između izračunate kolokalizacije za ER α -PGC-1 α i ER β -PGC-1 α .



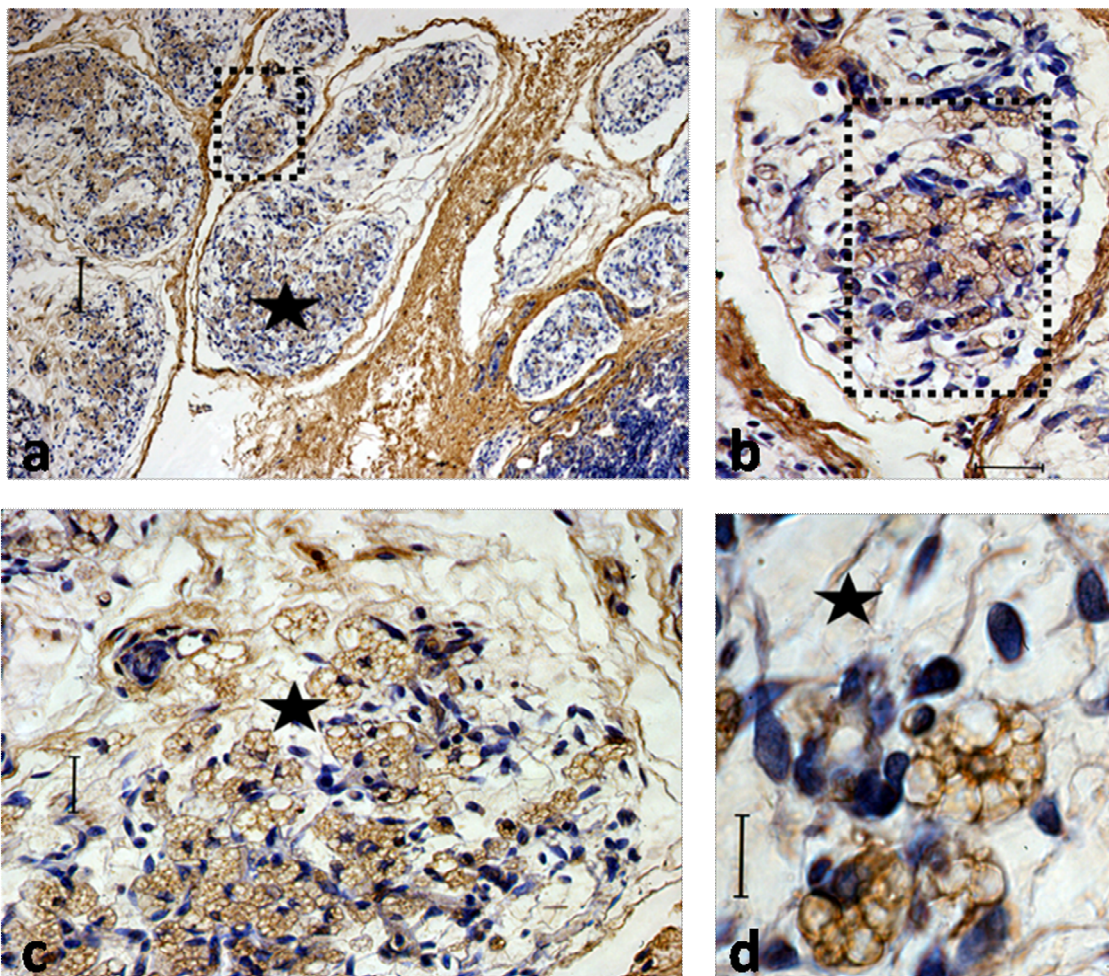
Slika 49. (A) Imunofluorescentna kolokalizacija ER i PPAR γ u humanom fBAT. (a) ER α , (b) PPAR γ , (c) kolokalizacija ER α i PPAR γ , (d) ER β (e) PPAR γ , (f) kolokalizacija ER β i PPAR γ . (B) Grafički prikaz kolokalizacije. *, Poređenje kolokalizacije ER α i PPAR γ , sa ER β i PPAR γ , *** <0.005. Orig. uveličanje: 100x.



Slika 50. (A) Imunofluorescentna kolokalizacija ER i PGC-1 α u humanom fBAT. (a) ER α , (b) PGC-1 α , (c) kolokalizacija ER α i PGC-1 α , (d) ER β (e) PGC-1 α , (f) kolokalizacija ER β i PGC-1 α . (B) Grafički prikaz kolokalizacije. Orig. uveličanje: 100x.

4.2.4.2. Imunohistohemijska detekcija BMP7

Na **slici 51** prikazana je imunohistohemijska detekcija BMP7 u humanom fBAT. Najjača reakcija se uočava u vezivno-tkivnoj stromi, dok je unutar lobusa jaka reakcija prisutna u citoplazmi mrkih adipocita.



Slika 51. Imunohistohemijska detekcija BMP7 u humanom fBAT. Reakcija je najizraženija u vezivno-tkivnoj stromi BAT. Jaka imunopozitivnost detektovana je u mrkim adipocitima i preadipocitima. Zvezdica – mrki adipociti: region isprekidane linije – lobus u procesu formiranja. Orig. uveličanje: (a) 10x, (b) 20x; (c) 40x; (d) 100x.

5. DISKUSIJA

Izlaganje pacova hladnoći indukuje kompleksan fiziološki odgovor BAT dovodeći do njegove hiperplazije, tj. proliferacije i diferencijacije prekursora mrkih adipocita, što je praćeno povećanjem ekspresije UCP1, biogeneze mitohondrija i β -oksidacije masnih kiselina (Suter, 1969; Himms-Hagen, 1990; Otašević i sar., 2011). Hiperplazija BAT je praćena značajnim povećanjem njegove mase (Bukowiecki i sar., 1986; Puerta i sar., 1990) što smo pokazali u prethodnim studijama (Buzadžić i sar., 2004; Petrović i sar., 2005). Rezultati ovog rada jasno pokazuju da je ovaj fenomen BAT, bilo da je indukovano hladnoćom ili predstavlja sastavni deo embrionalnog razvoja, pod strogom kontrolom brojnih transkripcionih faktora, koji koordinišu ekspresiju proteina odgovornih za stvaranje krajnjeg adipocitnog fenotipa. Među brojnim faktorima koji su uključeni u proces hiperplazije BAT, najznačajnija uloga pripada UCP1, PPAR γ i PGC-1 α (Puigserver, 1998).

5.1. TERMOGENI ODGOVOR BAT PRILIKOM IZLAGANJA HLADNOĆI

Poznato je da izlaganje životinja hladnoći dovodi do aktivacije SNS i oslobađanja noradrenalina čime se stimuliše produkcija cAMP i pojačava sinteza UCP1, lipoliza i oksidacija lipida. Za aktivnost PPAR γ neophodno je prisustvo PGC-1 α , koji se vezuje za PPRE mesto u promotorskom regionu UCP1. Saglasno tome, u ovom radu po prvi put pokazana je povećana ekspresija UCP1 već trećeg sata izlaganja hladnoći, dok šestog sata dostiže maksimalnu vrednost, kada je količina transkripta UCP1 povećana približno sedam miliona puta. U ostalim ispitivanim vremenskim tačkama nivo iRNK za UCP1 je i dalje veći od kontrolnog a u ovom radu pokazan je identičan odgovor na nivou

proteinske ekspresije UCP1. Ove promene su u direktnoj vezi sa povećanjem broja kristi mitohondrija u ovoj studiji, što predstavlja strukturnu i molekulsku osnovu za povećanje oksidativnog i termogenog kapaciteta BAT (Frey i Manella, 2000; Nisoli i sar., 2004; Otašević i sar., 2011).

Povećanje UCP1 ekspresije je praćeno paralelnim povećanjem ekspresije gena i proteina (takođe od 3. sata) za noradrenalin, PPAR γ i PGC-1 α , ukazujući na vremenski-koordinisanu indukciju transkripcionog i translacionog odgovora UCP1, PPAR γ i PGC-1 α tokom izlaganja BAT hladnoći.

Rezultati naše studije jasno pokazuju da hladnoća u *in vivo* uslovima snažno indukuje PGC-1 α na nivou iRNK, čija je količina veća u odnosu na kontrolu u svim ispitivanim tačkama, osim 12. sata. Slične rezultate pokazali su Petrović i sar. (2010) ispitujući efekat dugotrajnog izlaganja hladnoći na ekspresiju PGC-1 α . Prikazani ekspresioni profil PGC-1 α , glavnog promotera „oksidativnog fenotipa“ u BAT praćen je strukturnim promenama na mitohondrijama. Na nivou TEM pokazano je da su mitohondrije grupa izlaganih hladnoći brojnije, pravilnijeg oblika i sa brojnim paralelno-uređenim kristama. Šta više, ultrastrukturna analiza je pokazala neodvojivost strukture i funkcije mitohondrija, jer je povećan nivo ekspresije ovog proteina pokazan već 3. sata izlaganja hladnoći praćen odgovarajućim strukturnim promenama mitohondrija.

U isto vreme, pokazana je povećana proteinska ekspresija za Drp1 i Mfn2 u svim ispitivanim tačkama izlaganja hladnoći, što ukazuje na preciznu regulaciju ekspresije transkripcionih faktora i proteina uključenih u biogenezu mitohondrija u cilju zadovoljenja termogenih potreba tkiva. Da li je ekspresija mitofuzina i Drp1 indukovana direktno niskom temperaturom nije poznato. Poznato je da PGC-1 α aktivira ekspresiju Mfn2 preko ERE (*engl.* estrogen related receptor) (Soriano i sar., 2006). Moguće je da se sličan mehanizam aktivira i na hladnoći,

obzirom na vremenski koordinisanu indukciju PGC-1 α i Mfn2 pokazanu u našoj studiji.

Dinamične morfološke promene mitohondrija omogućene su najvećim delom njihovom deobom, zatim njihovom međusobnom fuzijom i translokacijom (Bereiter-Hanh, 1990; Chan, 2006; Petrovic i sar., 2008, Otašević i sar.; 2011). Deoba i fuzija mitohondrija kontrolisane su Drp1 i Mfn2 GTPazama. Pored toga što učestvuje u deobi mitohondrija, Drp1 izgleda ima udela u remodeliranju kristi mitohondrija (Bereiter-Hanh, 1990). Povećana proteinska ekspresija za Drp1 i Mfn2 pokazana u našem eksperimentu ukazuje da se intezivna deoba i fuzija mitohondrija odigrava u isto vreme, što može da ukazuje na postojanje mitohondrijalnog retikuluma. Sa aspekta mitohondriogeneze postavlja se pitanje zašto bi se mitohondrije BAT istovremeno delile i fuzionisale?

Poznato je da ova dva procesa kontrolišu oblik, dužinu i distribuciju mitohondrija (Chan, 2006; Otašević i sar., 2011) i verovatno da je balans između ova dva procesa neophodan za očuvanje njihove morfologije. Osim toga, fuzija i deoba omogućavaju razmenu sadržaja mitohondrija kao i njihovih membrana, a takođe menjajući oblik mitohondrija, omogućavaju njihovu distribuciju do lipidnih tela, što je posebno važno sa aspekta hladnoćom indukovane termogeneze i oksidacije masnih kiselina.

Povećanje Drp1 pokazano u ovoj studiji važno je sa još jednog aspekta – biogeneze peroksizoma, procesa koji prati hiperplaziju BAT i termogenu aktivnost. Naime, Drp1 protein ima sposobnost hidrolize GTP čime dolazi do njegove konformacione promene koja ima za cilj odvajanje membrana tokom deobe mitohondrija i peroksizoma (Chan, 2006).

Među brojnim transkripcionim faktorima uključenim u mitohondriogenezu mrkih adipocita, poslednjih nekoliko godina posebna pažnja je posvećena izučavanju NRF1 (Nisoli i sar., 2004).

Pokazano je da ovaj faktor kontroliše ekspresiju komponenti respiratornog lanca ali i proteine koji regulišu transkripciju i replikaciju mitohondrijalnog genoma (Wu i sar., 1999; Finck i Kelly, 2006). U našoj studiji pokazana je snažna indukcija ekspresije proteina za NRF1 tokom izlaganja pacova hladnoći u svim ispitivanim tačkama u odnosu na kontrolu, a sličan ekspresioni profil PGC-1 α ukazuje na učešće NRF1 u biogenezi mitohondrija. U prilog ovome idu podaci da pojačana ekspresija NRF1 dovodi do povećanog broja mitohondrija u srčanom tkivu (Xia i sar., 1997) i da PGC-1 α svoj efekat na mitohondriogenezu ostvaruje delom u interakciji sa NRF1 (Kozak, 2000; Vercauteren i sar., 2006).

Treba istaći da su naši podaci o promenama ekspresije NRF1 tokom diferencijacije mrkih adipocita kontradiktorni podacima dobijenim u *in vitro* uslovima. Naime, Villena i sar. (2002) su pokazali da se nivo NRF1 proteina smanjuje tokom diferencijacije mrkih adipocita u kulturi. Ovakva razlika može se objasniti odsustvom inervacije mrkih adipocita u *in vitro* uslovima, što nam ukazuje da je izlaganje hladnoći, odnosno simpatička stimulacija, jedan od glavnih aktivatora NRF1.

Imajući u vidu da su brojni promotori gena koji kodiraju proteine respiratornog lanca regulisani NRF1, rezultati vremenski zavisnih promena količine mtDNK pokazani u ovoj studiji nisu očekivani. Naime, tokom trajanja eksperimenta naizmenično se smenjuju periodi smanjenja i povećanja količine mtDNK u odnosu na kontrolu. Tačnije, 3., 12. i 72. sata izlaganja hladnoći dolazi do smanjenja, a 6. i 24. sata do povećanja količine mtDNK. Jedino grupa izlagana hladnoći 48 sati održava količinu mtDNK na kontrolnom nivou. Ovakve vremenski zavisne promene količine mtDNK tokom izlaganja hladnoći ukazuju na zavisnost od faze izlaganja, i ukazuju na kompleksnost mehanizama uključenih u regulaciju ekspresije mtDNK. Nedavno smo pokazali da tokom najranijih faza izlaganja hladnoći dolazi do promena u ekspresiji proteina komponentata elektron-transportnog lanca (Vučetić i sar.,

2011), pa ovakav odgovor mtDNK može predstavljati adaptivni mehanizam na uspostavljanje nove tkivne homeostaze.

Uzeti zajedno, naši rezultati pokazuju kompleksnost regulacije mitohondrijalne biogeneze tokom hladnoćom indukovane hiperplazije BAT pacova i ukazuju na strogo koordinisanu sintezu proteina koji su kodirani nukleusnim i mitohondrijalnim genomom, kao i na sinhronizovanost procesa deobe i fuzije mitohondrija.

5.2. INDUKCIJA PROLIFERACIJE I DIFERENCIJACIJE ĆELIJA ADIPOGENOG PULA

Brojni literaturni podaci pokazuju da su u proces proliferacije i diferencijacije mrkih adipocita uključeni brojni transkripcioni faktori, od kojih neki aktivacijom, a neki represijom, dovode do stvaranja krajnjeg fenotipa mrkih adipocita. Smatra se da pored PPAR γ , ključnog i neophodnog faktora diferencijacije *in vitro* i *in vivo* (Siersbaek i sar., 2011), podjednako važno mesto zauzimaju članovi porodice C/EBP, naročito C/EBP α .

Iako uloga ovog transkripcionog faktora nije u potpunosti razjašnjena, poznato je da je C/EBP α indukovan tokom kasnih faza diferencijacije adipocita (Rosen i sar., 2002), da ima snažan anti-mitotski efekat i da kooperativno sa PPAR γ indukuje ekspresiju nekoliko gena specifičnih za terminalnu diferencijaciju adipocita (Fernyhough i sar., 2007). Pokazano je i da C/EBP α održava neophodan nivo PPAR γ i da omogućava uspostavljanje insulin-zavisnog unosa glukoze u mrke adipocite (Hamm i sar., 1999).

Međutim, literaturni podaci pružaju veoma različite informacije o promenama genske ekspresije C/EBP α , naročito sa aspekta međusobnog odnosa ovog faktora i PPAR γ tokom diferencijacije mrkih adipocita. Pokazano je da ekspresija C/EBP α u *in vitro* uslovima dovodi do indukcije PPAR γ (Hamm i sar., 1999) i da preadipociti imaju vrlo sličan ekspresioni profil ova dva transkripciona faktora. Istražujući

diferencijaciju preadipocita pokazan je nizak, jedva detektabilan nivo PPAR γ i C/EBP α trećeg dana u kulturi ćelija, dok se značajno povećanje ekspresije PPAR γ detektuje 5. dana, a C/EBP α 7. dana diferencijacije (Chen i sar., 2007).

Rezultati naše studije pokazuju da hladnoća ostvaruje suprotan efekat na gensku ekspresiju PPAR γ i C/EBP α . Naime, već od 3. sata indukovani je brz transkripcioni odgovor PPAR γ dok se u isto vreme gasi odgovor C/EBP α u BAT. Odstupanja od ovog rezultata u odnosu na sinhronizovane promene genske ekspresije PPAR γ i C/EBP α mogu se objasniti jednim delom time što podaci o ekspresiji ova dva faktora proizilaze uglavnom iz *in vitro* studija, koje pored brojnih prednosti, ipak ne mogu u potpunosti oslikati *in vivo* uslove.

Sa druge strane, ovakav rezultat može biti doveden u vezu sa intenzivnom proliferacijom u BAT tokom izlaganja hladnoći. Naime, C/EBP α se akumulira prvenstveno u postmitotičkim diferenciranim adipocitima (Hendricks-Taylor i Darlington, 1995; Tao i Umek, 2000). Imajući u vidu gotovo u potpunosti suprimiran transkripcioni odgovor C/EBP α tokom celog ispitivanog perioda od 72 sata, možemo zaključiti da ovakva ekspresija C/EBP α korelira pre svega sa proliferativnim kapacitetom BAT i ukazuje na značajnu proliferativnu ulogu u prvim satima hladnoćom indukovane hiperplazije, u isto vreme kada PPAR γ indukuje diferencijaciju postojećih prekursora. Nije isključeno da posle 72 sata izlaganja hladnoći dolazi do indukcije C/EBP α i da doprinosi i terminalnoj diferencijaciji kao i već pokazanoj ulozi u održavanju nivoa PPAR γ .

U prilog snažno indukovanoj proliferaciji u BAT već od trećeg sata izlaganja hladnoći govori proteinska ekspresija Ki-67 i PCNA pokazana u ovoj studiji. Tokom ispitivanog perioda, grupe izlagane hladnoći pokazale su povećanje citoplazmatske reakcije za PCNA što govori o povećanoj sintezi ovog proteina. Pored toga, zabeležili smo translokaciju ovog transkripcionog faktora iz citoplazme u nukleuse, gde se inače aktivira (Cox, 1997), a najveći broj nukleusa koji je pokazao

imunoreaktivnost je uočen u grupi koja je boravila na niskoj temperaturi 72 sata.

Na nivou TEM, povećana učestalost prekursorskih ćelija adipocita u svim grupama izlaganim hladnoći govori u prilog povećanoj ekspresiji markera proliferacije. Pored toga, prekursorske ćelije su pokazale znake intenzivne sintetske aktivnosti kao što su: euhromatski nukleusi, istaknuti nukleolusi, interhromatinske i perihromatinske granule, perihromatinski fibrili, brojne granulacije glikogena i poliribozomi kao i povećan broj cisterni endoplazmatičnog retikuluma. Neretko su zapaženi znaci mitotske aktivnosti, centriole u citoplazmi preadipocita i intersticijskih ćelija. Ovakvi rezultati snažno indukovane proliferacije ukazuju da u BAT postoji pul mirujućih, prekursorskih ćelija koje su osposobljene da na adekvatan stimulus omoguće brz odgovor tkiva, kao što je slučaj u ovoj studiji.

U ovoj studiji ispitan je ekspresioni profil drugog člana PPAR familije – PPAR δ , čija uloga u BAT nije u potpunosti razjašnjena. Izlaganje hladnoći snažno inicira transkripcioni odgovor PPAR δ počev od 24. sata u ovoj studiji. Imajući u vidu da je genska ekspresija za UCP1 i PPAR γ inicirana mnogo ranije (već trećeg sata), i da se količina iRNK za PPAR γ privremeno vraća na kontrolni nivo u isto vreme kada se dešava indukcija PPAR δ , to nam ukazuje na moguće funkcionalno dopunjavanje članova PPAR familije u regulaciji ekspresije UCP1. U prilog ovome govori i podatak da miševi koji imaju povećanu ekspresiju PPAR δ pokazuju i povećanu ekspresiju gena za UCP1 i obrnuto – delecija gena za PPAR δ u *in vitro* uslovima ne afektuje diferencijaciju mrkih adipocita, ali smanjuje gensku ekspresiju UCP1 (Wang, 2010).

Takođe nije isključeno da povećana ekspresija PPAR δ dovodi do povećanja oksidativnog kapaciteta u mitohondrijama BAT, što je pokazano za mišićno tkivo (Angione i sar., 2011).

Funkcionalna aktivacija BAT praćena je promenama ne samo na nivou mitohondrija, nego i na nivou lipidnih tela. Hladnoća dovodi do promena lipidnog metabolizma, što za posledicu ima intenzivnu lipolizu

(Cannon i Nedergaard, 2004; Otašević i sar., 2011). Usitnjavanje lipidnih tela u citoplazmi mrkih adipocita, kao parametar intenzivne lipolize, zabeleženo je već 3. sata izlaganja hladnoći i uočeno je na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije. Ovaj proces se dešava na račun oslobađanja masnih kiselina koje će biti transportovane do mitohondrija i peroksizoma pomoću proteina FABP4. Uzimajući u obzir ulogu ovog proteina u BAT, njegova indukcija pokazana u ovoj studiji kao i rezultati svetlosne i elektronske mikroskopije u skladu su sa promenama lipidnog metabolizma na hladnoći. Na taj način omogućen je adekvatan odgovor tkiva i ubrzana oksidacija masnih kiselina u peroksizomima i mitohondrijama. Osim toga, najveća količina iRNK za FABP4 je zabeležena u istoj ispitivanoj tački (12. sat) kada je pokazana maksimalna količina iRNK za PPAR γ , što govori o preciznoj i usklađenoj regulaciji ekspresije gena uključenih u lipidni metabolizam.

U ovoj studiji ispitani su i nedavno pronađeni proadipogeni faktori – članovi porodice KLF9 i KLF15. Imajući u vidu da KLF15 ostvaruje direktnu interakciju sa promotorom gena za UCP1 (Yamamoto i sar., 2010), pokazano povećanje genske ekspresije od 48. sata izlaganja hladnoći jasno ukazuje na učešće KLF15 u regulaciji ekspresije UCP1. Nije isključena uloga ovog transkripcionog faktora i u procesu diferencijacije tokom hladnoćom indukovane hiperplazije BAT, obzirom da su funkcionalna CACCC vezujuća mesta KLF15 pronađena u kontrolnim regionima C/EBP α i PPAR γ . Drugi ispitivani transkripcioni faktor ove familije KLF9 u ovom radu je značajno indukovano samo 24. sata, dok je u svim ostalim tačkama ispod kontrolnog nivoa. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Pei i sar. (2011) koji su nedavno pokazali da KLF9 ima udela u adipogenezi transaktivacijom PPAR γ u središnjem periodu *in vitro* diferencijacije. Međutim, ovakav ekspresioni profil KLF9 zahteva dalja istraživanja, u smislu utvrđivanja odnosa sa drugim transkripcionim faktorima uključenim u proces hiperplazije BAT i mogućeg sinergističkog delovanja sa drugim faktorima (Carey, 1998; Siersaek, 2012).

U ovom radu je po prvi put pokazano da hladnoća indukuje ekspresiju Myf5, pokazujući da ovaj faktor nije specifični marker mioblasta kako se ranije mislilo, i da u BAT postoji populacija ćelija koja eksprimira Myf5. Ovaj rezultat se može dovesti u vezu sa koordinisanim povećanjem PCNA ekspresije i BMP7 od 24. sata pokazanim u ovoj studiji. Imajući ovo u vidu, kao i povećanje učestalosti preadipocita u grupama izlaganim hladnoći, moguće je da su u pitanju prekursorske ćelije za koje su Seale i sar. (2008) pokazali da su zajednički prekursori poprečno-prugastih mišićnih ćelija i mrkih adipocita. Ipak, ovo pitanje ostaje otvoreno i zahteva imunohistohemijsku lokalizaciju ovog proteina.

Pored čitave mreže transkripcionih faktora koji regulišu proces hiperplazije BAT, proliferacija i diferencijacija mrkih adipocita afektovana je brojnim hormonima i signalima spoljašnje sredine, kao što su faktori rasta iz porodice BMP. Pokazano je da ovi faktori tokom ranog embrionalnog razvika stvaraju koncentracioni, odnosno morfogeni gradijent prenoseći signale iz spoljašnje sredine. BMP7 se sintetiše u blizini prekursorskih ćelija i krvnih sudova i ima važnu ulogu u očuvanju mikrokruženja (Schulz i Tseng, 2009). U ovoj studiji pokazana je indukcija proteinske ekspresije BMP7 od 3. sata, dok je imunopozitivnost detektovana u mrkim adipocitima, preadipocitima, a najjača reakcija je pokazana u vezivno-tkivnoj stromi. Ovo ukazuje da je vanćelijski matriks značajan depo ovog proteina, i ukazuje na mogućnost vezivanja BMP7 za neke od komponenti matriksa BAT. Slične rezultate su dobili Bobacz i sar. (2008) ispitujući ulogu BMP7 u hroničnom artritisu, gde su pokazali da BMP7 ima sposobnost vezivanja za fibrilin.

Isti obrazac BMP7 imunoekspresije u humanom fBAT kao u animalnom modelu može da ukazuje na konzerviranu ulogu BMP7 u hiperplaziji BAT, kako u uslovima hladnoćom indukovane hiperplazije tako i u hiperplaziji tokom razvoja BAT.

BMP7 pored uloge u akumulaciji lipida, jedini ima sposobnost indukcije UCP1 ekspresije, za razliku od drugih članova ove porodice (BMP2, BMP4 i BMP6). BMP4 adipogeni faktor WAT, suprimira ekspresiju UCP1 u mrkim preadipocitima, uprkos efektu koji ostvaruje na lipide (Tseng i sar., 2008). U ovom radu je genska ekspresija BMP4 indukovana hladnoćom već 12. sata i dostiže maksimalan nivo u istoj ispitivanoj tački (48. sat) kada je zabeležen maksimalan nivo transkripcije za BMP7. Kako su preadipociti BAT na strukturnom nivou karakteristični upravo po početnom nakupljanju lipida i mitohondrija u citoplazmi, moguće je da BMP4 i BMP7 kooperativno dovode do deponovanja lipida u ovim ćelijama.

Pored toga, detektovana translaciona koekspresija BMP7 i UCP1 prikazana u ovom radu govori u prilog tome da BMP7 ima ulogu u termogenom odgovoru tkiva – aktivacijom UCP1. Pored uloge u adipogenezi, pokazano je da BMP7 može regulisati potrošnju energije afektujući ekspresiju gena uključenih u funkciju i biogenezu mitohondrija (Zamani i Brown, 2011), što ukazuje na višestruke uloge ovog proteina tokom proliferacije i diferencijacije BAT.

5.3. INDUKCIJA ANGIOGENEZE U BAT

Izrazita plastičnost koja odlikuje BAT zahteva usaglašenost procesa adipogeneze i angiogeneze, koja se uočava kako tokom rasta tkiva, tako i tokom njegove regresije. Ovo je omogućeno ćelijskom komunikacijom (adipocita, preadipocita i endotelskih ćelija) putem brojnih angiogenih faktora, što ima za posledicu brzu aktivaciju mitoze u prekursorima mrkih adipocita i endotelskim ćelijama (Cao, 2007). VEGF se smatra najvažnijim angiogenim faktorom, neophodnim za indukciju formiranja krvnih sudova (Hausman i Richardson, 2004).

U ovom radu pokazano je da BAT tokom hladnoćom indukovane hiperplazije eksprimira značajne količine iRNK i proteina za VEGF, što je u skladu sa velikim kapacitetom ovog tkiva za hipertrofiju. Povećanje

nivoa VEGF iRNK detektovano je u svim ispitivanim tačkama tokom izlaganja hladnoći, a najveća zabeležena količina je pokazana 24. sata. Ovi podaci su jednim delom u skladu sa rezultatima Asana i sar, (1997), koji su istraživali efekat hroničnog izlaganja i zabeležili prolazno povećanje genske ekspresije VEGF od prvog do četvrtog sata izlaganja hladnoći. Štaviše, rezultati imunohistohemijske detekcije VEGF pokazali su progresivno povećanje imunopozitivnosti već od 3. sata u poređenju sa kontrolom, a najveća gustina kapilarne mreže se uočava 24. sata kada je detektovan maksimum ekspresije VEGF iRNK.

Hladnoćom indukovana genska ekspresija VEGF i endoglina ukazuje na kooperativno učešće ova dva faktora u angiogenezi. Naime, novija istraživanja ukazuju na značaj uloge TGF β u signalnim putevima uključenim u razvoj kapilarne mreže. Endoglin predstavlja novi i slabo istražen regulatorni element TGF β receptornog kompleksa, i smatra se važnim indikatorom proliferacije endotelskih ćelija (Fonsatti i Maio, 2004; Bernabeu i sar., 2007). Važnost endoglina u vaskularnoj morfogenezi je pokazana *in utero* uginućem miševa koji su bili deficijentni za ovaj faktor rasta (Bourdeau i sar., 1999; Arthur i sar., 2000).

U našoj studiji pokazano je značajno povećanje genske ekspresije za endoglin počev od 12. sata izlaganja hladnoći, i visok nivo se održava do kraja ispitivanog perioda. Signalni putevi endoglina su slabo ispitani, ali pretpostavljamo da endoglin ostvaruje efekat jednim delom na angiogenezu zajedno sa BMP7, imajući u vidu da su oba člana TGF- β porodice afektovana hladnoćom. Pored toga endoglin ima uticaja na adheziju endotelskih ćelija, migraciju, proliferaciju i interesantno, mobilizaciju stem ćelija iz njihovog mikrookruženja (Conley i sar., 2004; Bernabeu i sar., 2007), što je pokazano i za BMP7.

Sa aspekta proliferacije endotelskih ćelija posebno su interesantni podaci imunohistohemijske detekcije PCNA i Ki-67 pokazane u ovoj studiji, kao i sličan odgovor tkivne ekspresije VEGF i Ki-67. U skladu sa detekcijom ovih ćelija u BAT možemo pretpostaviti da indukcija PCNA

dovodi do proliferacije prekursora mrkih adipocita i endotelskih ćelija BAT, dok Ki-67 dovodi do proliferacije prevashodno endotelskih ćelija.

Promene na nivou gena i proteina uključenih u proces angiogeneze u skladu su sa ultrastrukturnim promenama. Naime, na ultrastrukturnom nivou, zapazili smo da je vazodilatacija prvi odgovor tkiva na izlaganje hladnoći, kako bi se omogućilo neophodno snabdevanje tkiva kiseonikom i supstratima, a zatim se uključuje i angiogeneza koja je neophodna za rast i uvećanje BAT. Povećanje broja kapilara u odnosu na kontrolu uočeno je u svim grupama izlaganim hladnoći. Ovi rezultati su u saglasnosti sa našim prethodnim rezultatima morfološko-stereološke analize u kojoj smo pokazali da izlaganje hladnoći dovodi do povećanja kapilarne mreže i broja kapilara u BAT (Korać i sar., 2008). Pored toga, uočeno je povećanje učestalosti adipogeno-angiogenih klastera koje čine najvećim delom preadipociti i endotelske ćelije, što ukazuje na neodvojivost dva procesa – adipogeneze i angiogeneze u BAT tokom hladnoćom izazvane hiperplazije.

Sa aspekta proliferacije preadipocita i endotelskih ćelija zanimljivi su rezultati imunohistohemijske detekcije PCNA i Ki-67 u adipogeno-angiogenim klasterima u ovoj studiji, koji pokazuju lokalizaciju oba proteina u preadipocitima i endotelskim ćelijama pojedinih adipogeno-angiogenih klastera, ali su uočeni i klasteri u kojima samo preadipociti eksprimiraju markere proliferacije, kao i klasteri u kojima to čine samo endotelske ćelije. Poznato je da se endotelske ćelije izolovane iz različitih depoa masnog tkiva razlikuju u proliferativnom kapacitetu (Cao, 2007). U našoj studiji smo pokazali da takve razlike postoje i u okviru istog depoa, što ukazuje na značaj mikrookruženja, odnosno ćelijske niše u tkivu, koja očito specifično organizuje i „vaspitava“ ćelije tokom diferencijacije.

5.4. HUMANO FETALNO BAT

5.4.1. Uloga ER u razvoju humanog fBAT

Nakon utvrđivanja odgovora glavnih transkripcijskih faktora i proteina uključenih u hiperplaziju BAT pacova kao i strukturnih promena u tkivu, ispitana je proteinska ekspresija transkripcijskih faktora uključenih u razvoj humanog fBAT.

Razviće masnog tkiva, kako kod životinja tako i kod čoveka, pod uticajem je većeg broja hormona, među kojima pored noradrenalina i insulina, značajno mesto pripada estrogenu. Estrogen ostvaruje direktan efekat na BAT regulišući deponovanje lipida, broj adipocita, a pokazano je i da značajno doprinosi potrošnji energije (Cooke i Naaz, 2004).

U ovoj studiji proteinska analiza ER tokom različitih nedelja razvića BAT, počev od XVII zaključno sa XXIII nedeljom, pokazala je vremenski zavisnu indukciju translacionog odgovora ER α . Istovremeno, zabeležena je slaba i prolazna proteinska ekspresija ER β , što ukazuje da estrogen ostvaruje efekat preko obe receptorne izoforme ali da je dominantna izoforma eksprimirana u humanom fBAT ER α . Ovo dodatno potvrđuje imunohisto- i imunocitohemijska detekcija ER u ovom radu.

Prisustvo imunogold partikula kojima smo pokazali prisustvo ER α u mrkim adipocitima, preadipocitima, mezenhimskim stem ćelijama kao i u endotelskim ćelijama ukazuje na moguće učešće ovog receptora u procesu adipogeneze tokom fetalnog perioda. Imajući u vidu detekciju imunogold partikula za ER β samo u zrelih mrkim adipocitima, naši rezultati pokazuju da estrogen svoj efekat na diferencijaciju mrkih adipocita ostvaruje najvećim delom preko ER α . Sličan odnos ekspresije ER pokazali su Dieudonné i sar. (2004) proučavajući oba tipa receptora u WAT čoveka.

Detaljnoum ultrastrukturnom i imunocitohemijskom analizom pokazali smo prisustvo obe izoforme ER u nukleusima, citoplazmi i

mitohondrijama zrelih mrkih adipocita, ali i na nivou ćelijske membrane.

Iako estrogen ostvaruje svoj efekat najvećim delom direktno regulišući ekspresiju gena u nukleusu, pokazano je da mala populacija ovih receptora može biti pridružena ćelijskoj membrani i inicirati brzi, negenomski efekat. Ovi receptori mogu formirati komplekse sa drugim proteinima kao što je kaveolin 1, indukujući povećanje nivoa kalcijumovih jona i azot monoksida (Luconi i sar., 2002). Naša grupa je pokazala da ovi sekundarni glasnici imaju važnu ulogu u procesu mitohondriogeneze BAT (Petrovic i sar., 2005; Markelić i sar., 2011). Stoga, saglasno sa rezultatima lokalizacije ER α i ER β u mitohondrijama pokazanim u ovoj studiji, i podacima drugih grupa (Jazbutyte i sar., 2009) koje su detektovale ERE u mitohondrijalnom genomu čoveka, možemo zaključiti da estrogen ostvaruje direktan efekat na mitohondrije humanog fBAT preko obe izoforme. Pored toga, nukleusna i mitohondrijalna lokalizacija ER u ovom radu sugerise postojanje koordinisane regulacije genske ekspresije između ova dva ćelijska odeljka u humanom fBAT.

Imajući u vidu pokazano prisustvo oba ER u zrelim mrkim adipocitima, kao i slabu kolokalizaciju ER α i ER β , možemo spekulisati o njihovim različitim ulogama u procesu adipogeneze. Tome dodatno doprinose rezultati imunocitohemije koji su pokazali prisustvo ER α u ćelijama diferencijacionog niza BAT, što ukazuje na ulogu ovog receptora u procesu diferencijacije. Šta više, na to jasno ukazuje kolokalizacija ER α sa PPAR γ . Iako ER β nije kolokalizovan sa PPAR γ , pokazana je značajna kolokalizacija sa PGC-1 α . Prisutnost obe receptorne izoforme u mitohondrijama, kao i kolokalizacija oba receptora sa PGC-1 α jasno ukazuje na mogućnost da estrogen ostvaruje efekte na mitohondrije preko oba tipa receptora kao i da interaguje sa PGC-1 α .

5.4.2. Termogeni kapacitet humanog fBAT

Paralelno sa praćenjem ekspresije ER tokom hiperplazije humanog fBAT, u ovom radu praćena je proteinska ekspresija UCP1, PPAR γ i PGC-1 α , ključnih regulatora termogenog kapaciteta i diferencijacije BAT. Povećanje količine ovih proteina pokazano u XXIII nedelji fetalnog razvoja BAT u odnosu na XVII nedelju, idu u prilog tkivnoj hiperplaziji BAT tokom gestacije, kada se masa humanog fBAT i količina UCP1 progresivno povećavaju kako bi dostigli svoj maksimum po rođenju (Symonds i sar., 2003).

Rezultati proteinske ekspresije UCP1, PPAR γ i PGC-1 α pokazuju koordinisanu ekspresiju ovih proteina i u humanom fBAT, u cilju termogenog osposobljavanja tkiva. Imajući u vidu rezultate ove studije možemo zaključiti da razvoj humanog fBAT podrazumeva slične, ako ne i iste mehanizme aktivacije kao BAT pacova. Pokazana tkivna ekspresija noradrenalina, koji pokazuje isti obrazac ekspresije u obe studije, jasno ukazuje na ulogu simpatičke inervacije u razvoju fBAT kod ljudi.

Ova studija je po prvi put pokazala da se BAT javlja ranije tokom fetalnog perioda, i da je UCP1 detektabilan već u XVII nedelji razvića. Ultrastruktura humanog fBAT do sada je pokazana u samo nekoliko radova, fokusiranih na ultrastrukturne karakteristike i identifikaciju anatomske lokalizacije u organizmu (Merklin, 1974; Poissonnet i sar., 1984; Zancanaro i sar., 1995). Histološki podaci iz ranijih studija ukazuju da razviće BAT kod čoveka počinje oko šestog meseca fetalnog perioda (Merklin, 1974; Moragas i Toran, 1983).

Na ultrastrukturnom nivou ovo tkivo je pokazalo sve važne karakteristike BAT: citološke odlike mrkih adipocita i preadipocita, inervaciju i bogatu prokrvljenost. Na osnovu velikog broja prekursorskih ćelija MSC i preadipocita različitih ultrastrukturnih karakteristika, jasno je da tkivo prolazi kroz intenzivne procese proliferacije i diferencijacije.

Na osnovu Western blot analize i imunohisto/imunocitohemije, pokazano je da je ER α dominantna izoforma i da estrogen svoj efekat na diferencijaciju ostvaruje uglavnom preko ovog receptora, imajući u vidu rezultate kolokalizacije, verovatno direktnom interakcijom sa PPAR γ . Pored toga, imunocitohemijska analiza ukazuje da estrogen ostvaruje direktan efekat na mitohondrije ovog tkiva preko oba tipa receptora, bilo da to čini regulacijom gena mitohondrijalnog genoma i/ili mogućom interakcijom sa PGC-1 α , ključnim efektorom mitohondriogeneze.

Činjenica da se preadipociti u animalnom modelu i u studiji na humanom fBAT najčešće sreću u blizini krvnih sudova, kao i to da su po nastanku u fizičkom kontaktu sa endotelskom ćelijom ukazuje na mogućnost zajedničkog porekla ovih ćelija. Sa druge strane, pokazana ekspresija Myf5 u BAT pacova kao i činjenica da je ovaj miogeni faktor indukovano hladnoćom ukazuje na postojanje prekursora koji imaju mogućnost diferencijacije u pravcu mrkih adipocita ili poprečno-prugastih mišićnih ćelija.

Iz svih navedenih rezultata ove studije proizilazi hipoteza da u humanom fBAT postoje dva pula preadipocita, jedan pul koji deli zajedničko poreklo sa endotelskim ćelijama, sa kojima je i prostorno blizak i drugi pul koji deli poreklo sa mišićnim ćelijama, i koji u citoplazmi poseduje nekoliko lipidnih tela i sarkomera-slične strukture. Za sada su ovakve pretpostavke samo spekulativne i zahtevaju dalja istraživanja.

Posebno interesantan je rezultat koji je proizašao detekcijom UCP1 u humanom fBAT, kao i u studiji na pacovima. Kao što je već prethodno pomenuto, jedna od glavnih karakteristika termogenog procesa BAT koja omogućava održavanje telesne temperature i potrošnju energije jeste aktivacija ekspresije UCP1, markera mrkih adipocita. Stoga, lokalizacija UCP1 u endotelskim i poprečno-prugastim mišićnim ćelijama otvara brojna pitanja, pre svega da li UCP1 ima ulogu da reguliše produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao što je pokazano u endotelskim ćelijama (Porter, 2008).

Dalje, rezultati imunohistohemijske i ultrastrukturne analize razvoja humanog fBAT su otvorili još jedno pitanje: da li se koncept „niše stem ćelija“ može primeniti i na prekursorske ćelije ovog tkiva?

Hipoteza o niši stem ćelija postavljena je 1987. godine od strane Schofield (Schofield, 1987) kada je definisana kao dinamična struktura koja integriše brojne spoljašnje i unutrašnje signale i diktira dalju sudbinu stem ćelija. Nišu čine stem ćelije, potporne ćelije strome, njihove komunikacijske veze i adhezivne veze, komponente vanćelijskog matriksa koje prosleđuju mehaničke i druge signale. Među najvažnijim signalima koji imaju uticaj na nišu pominje se upravo morfogen BMP7, koji sekretovan u samoj niši ili van nje formira tzv. morfogeni gradijent i na taj način „daje“ instrukcije stem ćelijama.

Mi smo na nivou EM jasno uočili male grupacije ćelija koje odgovaraju opisu niše, ostvaruju međusobne kontakte, ali i kontakte sa komponentama vanćelijskog matriksa. Na nivou SM detektovali smo brojne proteine u vezivno-tkivnoj stromi humanog fBAT, a međusobna interakcija sa drugim morfogenima dodatno komplikuje istraživanja održavanja, proliferacije i diferencijacije stem ćelija. Postoje podaci da i noradrenalin (Nedergaard i sar., 1995) koji smo detektovali u vezivno-tkivnoj stromi može imati ulogu morfogena.

Iako su istraživanja niše stem ćelija u začetku, jasno je koliko je njena uloga važna. Pokazano je da oblik ćelije, geometrija i elastičnost komponentata vanćelijskog matriksa imaju uticaja na regulaciju fiziologije i rasta ćelija (Folkman i Morcona, 1978). Stoga, možemo zaključiti na osnovu ultrastrukturnih rezultata naše studije da BAT poseduje mikrokruženja, odnosno niše stem ćelija koje imaju različit sklop i samim tim različito primaju i prenose signale iz spoljašnje sredine. Iako se ove ćelije veoma retko sreću u adultnom tkivu, u budućim istraživanjima bi trebalo ispitati na koje načine dolazi do prenosa različitih signala u biohemijske signale, a koji sa druge strane pokreću signalne puteve i dovode do promena ekspresije transkripcionih faktora.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati studije o hiperplaziji BAT kod pacova tokom izlaganja hladnoći i tokom razvoja fetalnog humanog BAT periodu čoveka, pokazali su da se u osnovi povećanja mase tkiva nalazi hiperplazija prekursorskih adipocitnih i endotelskih ćelija i da je ovaj proces pod strogom kontrolom odgovarajućih transkripcionih faktora. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Izlaganje pacova hladnoći aktivira termogeni program u BAT koji je praćen sinhronizovanom transkripcionom i translacionom aktivacijom ključnih regulatornih proteina termogenog programa – UCP1, PPAR γ i PGC-1 α (3. sat). Ekspresija ovih proteina je pokazana u humanom fBAT i zajedno sa ekspresijom estrogenskih receptora ukazuje na slične mehanizme aktivacije termogenog programa BAT kao u slučaju BAT pacova.
- Povećanje termogenog kapaciteta BAT pacova na ultrastrukturnom nivou je praćeno povećanom zastupljenošću mitohondrija, njihovom deobom i fuzijom, o čemu svedoči povećana ekspresija Drp1 i Mfn2.
- Pored PPAR γ , izlaganje pacova hladnoći dovodi do ekspresije drugih ispitivanih transkripcionih faktora: PPAR δ , KLF9, KLF15, Myf5, Nrf1 i represije C/EBP α .
- Hiperplazija BAT pacova i fBAT praćena je povećanjem broja preadipocita, endotelskih ćelija i intersticijskih ćelija, što je uočeno na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije. U osnovi proliferacije nalazi se povećana tkivna i proteinska ekspresija PCNA i Ki-67 pokazana u ovoj studiji.
- Hiperplaziji BAT pacova i fBAT doprinosi intenzivirana angiogeneza, o čemu svedoči povećanje ekspresije VEGF i endoglina.

- U vezi sa proliferativnom sposobnošću pokazano je da su adipogeneza i angiogeneza vremenski i prostorno povezane, i da se ovi procesi odvijaju najvećim delom u adipogeno-angiogenim klasterima, kako u BAT pacova, tako i u humanom fBAT.
- Hiperplazija BAT pacova i fBAT podrazumeva aktivno remodeliranje vanćelijskog matriksa, posebno izraženo oko ćelija u procesu proliferacije i oko adipogeno-angiogenih klastera.

Uzeti zajedno, rezultati ukazuju na visoko-koordinisanu regulaciju genske i proteinske ekspresije praćenu odgovarajućim strukturnim promenama tokom hladnoćom indukovane hiperplazije BAT pacova kao i tokom razvoja BAT u humanom fetusu u cilju termogenog osposobljavanja fBAT. Razumevanje mehanizama koji dovode do aktivacije BAT dodatno doprinosi dosadašnjim saznanjima i otvara mogućnosti novih terapijskih pristupa.

7. LITERATURA

- Adams RH and Alitalo K. (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*.**8**: 464-478.
- Azfelius BA. (1970) Brown adipose tissue: its gross anatomy, histology and cytology. In: Brown Adipose Tissue. Ed. Linberg O. American Elsevier, New York, 1-31.
- Angione AR, Jiang C, Pan D, Wang YX and Kuang S. (2011) PPARdelta regulates satellite cell proliferation and skeletal muscle regeneration. *Skelet Muscle*.**1**: 33.
- Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J and Diamond AG. (2000) Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol*.**217**: 42-53.
- Asano A, Morimatsu M, Nikami H, Yoshida T and Saito M. (1997) Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold-induced angiogenesis. *Biochem J*.**328 (Pt 1)**: 179-183.
- Avram AS, Avram MM and James WD. (2005) Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J Am Acad Dermatol*.**53**: 671-683.
- Banerjee SS, Feinberg MW, Watanabe M, Gray S, Haspel RL, Denkinger DJ, Kawahara R, Hauner H and Jain MK. (2003) The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J Biol Chem*.**278**: 2581-2584.
- Bereiter-Hahn J. (1990) Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol*.**122**: 1-63.
- Bernabeu C, Conley BA and Vary CP. (2007) Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem*.**102**: 1375-1388.
- Bobacz K, Sunk IG, Hayer S, Amoyo L, Tohidast-Akrad M, Kollias G, Smolen JS and Schett G. (2008) Differentially regulated expression of growth

- differentiation factor 5 and bone morphogenetic protein 7 in articular cartilage and synovium in murine chronic arthritis: potential importance for cartilage breakdown and synovial hypertrophy. *Arthritis Rheum.***58**: 109-118.
- Bolte S and Cordelieres FP. (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc.***224**: 213-232.
 - Bourdeau A, Dumont DJ and Letarte M. (1999) A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest.***104**: 1343-1351.
 - Brey CW, Nelder MP, Hailemariam T, Gaugler R and Hashmi S. (2009) Kruppel-like family of transcription factors: an emerging new frontier in fat biology. *Int J Biol Sci.***5**: 622-636.
 - Bukowiecki LJ, Geloën A and Collet AJ. (1986) Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. *Am J Physiol.***250**: C880-887.
 - Buzadzic B, Korac A, Petrovic V and Korac B. (2004) Glutathione content, rate of apoptosis, and brown adipose tissue mass in rats exposed to different ambient temperatures. *J Therm Biol.***29**: 503-507.
 - Buzadzic B, Korac B and Petrovic V. (1999) The effect of adaptation to cold and re-adaptation to room temperature on the level of glutathione in rat tissues. *J Therm Biol.***24**: 373-377.
 - Cannon B and Nedergaard J. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.***84**: 277-359.
 - Cannon B, Connoley E, Obregon MJ and Nedergaard J. (1988) Perinatal activation of brown adipose tissue. In: *The Endocrine Control of the Fetus*. Eds. Kunzel W and Jesen A. Springer Verlag, Berlin, 306-320.
 - Cao Y. (2007) Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest.***117**: 2362-2368.
 - Carey M. (1998) The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell.***92**: 5-8.
 - Celi FS. (2009) Brown adipose tissue--when it pays to be inefficient. *N Engl J Med.***360**: 1553-1556.
 - Chan DC. (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell*

*Dev Biol.***22**: 79-99.

- Chan JY, Han XL, Kan YW. (1993) Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proc Natl Acad Sci.***90**: 11371-11375.
- Chapman AB, Knight DM, Dieckmann BS and Ringold GM. (1984) Analysis of gene expression during differentiation of adipogenic cells in culture and hormonal control of the developmental program. *J Biol Chem.***259**: 15548-15555.
- Chen SF, Zhu XT, Shu G, Gao SJ, Gao P and Jiang QY. (2007) [PPARgamma and C/EBPalpha mRNA expression in the primary culture of rat preadipocytes during differentiation]. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao.***40**: 272-275.
- Cinti S. (2001) The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc.***60**: 319-328.
- Cinti S. (2005) The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.***73**: 9-15.
- Cinti S. (2009) Reversible physiological transdifferentiation in the adipose organ. *Proc Nutr Soc.***68**: 340-349.
- Conley BA, Koleva R, Smith JD, Kacer D, Zhang D, Bernabeu C and Vary CP. (2004) Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem.***279**: 27440-27449.
- Cooke PS and Naaz A. (2004) Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood).***229**: 1127-1135.
- Cox LS. (1997) Who binds wins: Competition for PCNA rings out cell-cycle changes. *Trends Cell Biol.***7**: 493-498.
- Crandall DL, Hausman GJ and Kral JG. (1997) A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation.***4**: 211-232.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM and Kahn CR. (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.***360**:

1509-1517.

- Deroo BJ and Korach KS.(2006) Estrogen receptors and human disease.*J Clin Invest.***116**: 561-570.
- Dieudonne MN, Leneuve MC, Giudicelli Y and Pecquery R. (2004) Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *Am J Physiol Cell Physiol.***286**: C655-661.
- Enerback S. (2010) Human brown adipose tissue.*Cell Metab.***11**: 248-252.
- Entenmann G and Hauner H. (1996) Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. *Am J Physiol.***270**: C1011-1016.
- Farmer SR. (2006) Transcriptional control of adipocyte formation.*Cell Metab.***4**: 263-273.
- Fernyhough ME, Okine E, Hausman G, Vierck JL and Dodson MV.(2007) PPARgamma and GLUT-4 expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiation into an adipocyte.*Domest Anim Endocrinol.***33**: 367-378.
- Finck BN and Kelly DP. (2006) PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest.***116**: 615-622.
- Folkman J and Moscona A. (1978) Role of cell shape in growth control.*Nature.***273**: 345-349.
- Fonsatti E and Maio M. (2004) Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med.***2**: 18.
- Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA and Coppack SW. (2003) Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord.***27**: 875-888.
- Fredriksson JM, Nikami H and Nedergaard J. (2005) Cold-induced expression of the VEGF gene in brown adipose tissue is independent of thermogenic oxygen consumption. *FEBS Lett.***579**: 5680-5684.

- Frey TG and Mannella CA. (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.***25**: 319-324.
- Gessner K. (1551) *Conradi Gesneri Medici Tigurine Historiae Animalium Lib. I. De Quadrupedibus Uiuparis.* 842.
- Gesta S, Tseng YH and Kahn CR. (2007) Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.***131**: 242-256.
- Green H and Kehinde O. (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell.***5**: 19-27.
- Hamm JK, el Jack AK, Pilch PF and Farmer SR. (1999) Role of PPAR gamma in regulating adipocyte differentiation and insulin-responsive glucose uptake. *Ann N Y Acad Sci.***892**: 134-145.
- Hausman GJ and Richardson RL.(2004) Adipose tissue angiogenesis. *J Anim Sci.***82**: 925-934.
- Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB and Cooke PS. (2000) Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.***97**: 12729-12734.
- Hendricks-Taylor LR and Darlington GJ. (1995) Inhibition of cell proliferation by C/EBP alpha occurs in many cell types, does not require the presence of p53 or Rb, and is not affected by large T-antigen. *Nucleic Acids Res.***23**: 4726-4733.
- Himms-Hagen J. (1990) Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J.***4**: 2890-2898.
- Himms-Hagen J, Cui J, Danforth E, Jr., Taatjes DJ, Lang SS, Waters BL and Claus TH. (1994) Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am J Physiol.***266**: R1371-1382.
- Hutley LJ, Herington AC, Shurety W, Cheung C, Vesey DA, Cameron DP and Prins JB. (2001) Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.***281**: E1037-1044.

- Jazbutyte V, Kehl F, Neyses L and Pelzer T. (2009) Estrogen receptor alpha interacts with 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.***384**: 450-454.
- Johansson B. (1959) Brown fat: a review. *Metabolism.***8**: 221-240.
- Joyner JM, Hutley LJ and Cameron DP. (2001) Estrogen receptors in human preadipocytes. *Endocrine.***15**: 225-230.
- Kajimura S, Seale P and Spiegelman BM. (2010) Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab.***11**: 257-262.
- Klaus S. (1997) Functional differentiation of white and brown adipocytes. *Bioessays.***19**: 215-223.
- Klaus S, Seivert A and Boeuf S. (2001) Effect of the beta(3)-adrenergic agonist Cl316,243 on functional differentiation of white and brown adipocytes in primary cell culture. *Biochim Biophys Acta.***1539**: 85-92.
- Klingenspor M, Ivmeyer M, Wiesinger H, Haas K, Heldmaier G and Wiesner RJ. (1996) Biogenesis of thermogenic mitochondria in brown adipose tissue of Djungarian hamsters during cold adaptation. *Biochem J.***316 (Pt 2)**: 607-613.
- Klingenspor M. (2003) Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol.***88**: 141-148.
- Korac A, Buzadzic B, Petrovic V, Vasilijevic A, Jankovic A, Micunovic K and Korac B. (2008) The role of nitric oxide in remodeling of capillary network in rat interscapular brown adipose tissue after long-term cold acclimation. *Histol Histopathol.***23**: 441-450.
- Korac A, Verec M and Davidovic V. (2003) Insulin-induced iron loading in the rat brown adipose tissue: histochemical and electron-microscopic study. *Eur J Histochem.***47**: 241-244.
- Kozak LP. (2000) Genetic studies of brown adipocyte induction. *J Nutr.***130**: 3132S-3133S.
- Kumar KS, Kumar MMJ. (2008) Antiestrogen therapy for breast cancer: An overview. *Cancer Therapy.* **6**: 655-664.

- Kuzmivic J, Del Campo A, Lopez-Crisosto C, Morales PE, Pennanen C, Bravo-Sagua R, Hechenleitner J, Zepeda R, Castro PF, Verdejo HE, Parra V, Chiong M and Lavandero S. (2011) [Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure]. *Rev Esp Cardiol.***64**: 916-923.
- Lai L, Leone TC, Zechner C, Schaeffer PJ, Kelly SM, Flanagan DP, Medeiros DM, Kovacs A and Kelly DP. (2008) Transcriptional coactivators PGC-1alpha and PGC-1beta control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. *Genes Dev.***22**: 1948-1961.
- Lefebvre AM, Laville M, Vega N, Riou JP, van Gaal L, Auwerx J and Vidal H. (1998) Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes.***47**: 98-103.
- Lefterova MI and Lazar MA.(2009) New developments in adipogenesis.*Trends Endocrinol Metab.***20**: 107-114.
- Liang H and Ward WF. (2006) PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ.***30**: 145-151.
- Liesa M, Palacin M and Zorzano A. (2009) Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease.*Physiol Rev.***89**: 799-845.
- Loncar D. (1991) Convertible adipose tissue in mice.*Cell Tissue Res.***266**: 149-161.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ.(1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent.*J Biol Chem.***193**: 265-275.
- Luconi M, Forti G and Baldi E. (2002) Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol.***80**: 369-381.
- Markelic M, Velickovic K, Golic I, Otasevic V, Stancic A, Jankovic A, Vucetic M, Buzadzic B, Korac B and Korac A. (2011) Endothelial cell apoptosis in brown adipose tissue of rats induced by hyperinsulinaemia: the possible role of TNF-alpha. *Eur J Histochem.***55**: e34.
- Matthews J and Gustafsson JA. (2003) Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv.***3**: 281-292.

- Merklin RJ. (1974) Growth and distribution of human fetal brown fat. *Anat Rec.***178**: 637-645.
- Monjo M, Rodriguez AM, Palou A and Roca P. (2003) Direct effects of testosterone, 17 beta-estradiol, and progesterone on adrenergic regulation in cultured brown adipocytes: potential mechanism for gender-dependent thermogenesis. *Endocrinology.***144**: 4923-4930.
- Moragas A and Toran N. (1983) Prenatal development of brown adipose tissue in man. A morphometric and biomathematical study. *Biol Neonate.***43**: 80-85.
- Mori T, Sakaue H, Iguchi H, Gomi H, Okada Y, Takashima Y, Nakamura K, Nakamura T, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Matsuki Y, Ogawa W, Hiramatsu R and Kasuga M. (2005) Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J Biol Chem.***280**: 12867-12875.
- Nedergaard J, Bengtsson T and Cannon B. (2007) Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.***293**: E444-452.
- Nedergaard J, Herron D, Jacobsson A, Rehnmark S, Cannon B. (1995) Norepinephrine as a morphogen?: its unique interaction with brown adipose tissue. *Int J Dev Biol.***39**: 827-837.
- Nedergaard J, Petrovic N, Lindgren EM, Jacobsson A and Cannon B. (2005) PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. *BiochimBiophysActa.***1740**: 293-304.
- Nisoli E, Clementi E, Moncada S and Carruba MO. (2004) Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem Pharmacol.***67**: 1-15.
- Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Tsushima K, Shindo T, Fujiu K, Nishimura G, Maemura K, Yamauchi T, Kubota N, Suzuki R, Kitamura T, Akira S, Kadowaki T and Nagai R. (2005) Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab.***1**: 27-39.
- Otasevic V, Korac A, Buzadzic B, Stancic A, Jankovic A and Korac B. (2011) Nitric oxide and thermogenesis--challenge in molecular cell physiology. *Front Biosci (Schol Ed).***3**: 1180-1195.
- Pallottini V, Bulzomi P, Galluzzo P, Martini C and Marino M. (2008) Estrogen regulation of adipose tissue functions: involvement of estrogen receptor isoforms. *Infect Disord Drug Targets.***8**: 52-60.

- Pei H, Yao Y, Yang Y, Liao K and Wu JR. (2011) Kruppel-like factor KLF9 regulates PPARgamma transactivation at the middle stage of adipogenesis. *Cell Death Differ.***18**: 315-327.
- Petrovic V, Buzadzic B, Korac A, Vasilijevic A, Jankovic A and Korac B. (2010) NO modulates the molecular basis of rat interscapular brown adipose tissue thermogenesis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.***152**: 147-159.
- Petrovic V, Korac A, Buzadzic B and Korac B. (2005) The effects of L-arginine and L-NAME supplementation on redox-regulation and thermogenesis in interscapular brown adipose tissue. *J Exp Biol.***208**: 4263-4271.
- Petrovic V, Korac A, Buzadzic B, Vasilijevic A, Jankovic A, Micunovic K and Korac B. (2008) Nitric oxide regulates mitochondrial re-modelling in interscapular brown adipose tissue: ultrastructural and morphometric-stereologic studies. *J Microsc.***232**: 542-548.
- Poissonnet CM, Burdi AR and Garn SM. (1984) The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum Dev.***10**: 1-11.
- Porter RK. (2008) Uncoupling protein 1: a short-circuit in the chemiosmotic process. *J Bioenerg Biomembr.***40**: 457-461.
- Puerta ML, Nava MP, Abelenda M and Fernandez A. (1990) Inactivation of brown adipose tissue thermogenesis by oestradiol treatment in cold-acclimated rats. *Pflugers Arch.***416**: 659-662.
- Puigserver P, Herron D, Gianotti M, Palou A, Cannon B and Nedergaard J. (1992) Induction and degradation of the uncoupling protein thermogenin in brown adipocytes in vitro and in vivo. Evidence for a rapidly degradable pool. *Biochem J.***284 (Pt 2)**: 393-398.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M and Spiegelman BM. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.***92**: 829-839.
- Rial E and Gonzalez-Barroso MM. (2001) Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochim Biophys Acta.***1504**: 70-81.

- Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Proenza AM and Roca P. (2005) Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: possible role of the local steroid milieu. *Am J Physiol Endocrinol Metab.***288**: E200-207.
- Rosen E, Eguchi J and Xu Z. (2009) Transcriptional targets in adipocyte biology. *Expert Opin Ther Targets.***13**: 975-986.
- Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ and Spiegelman BM. (2002) C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.***16**: 22-26.
- Russell LK, Finck BN and Kelly DP. (2005) Mouse models of mitochondrial dysfunction and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.***38**: 81-91.
- Schofield K. (1987) A place to stay. *Volunt Leader.***28**: 9.
- Schulz TJ and Tseng YH. (2009) Emerging role of bone morphogenetic proteins in adipogenesis and energy metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev.***20**: 523-531.
- Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scime A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR and Spiegelman BM. (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.***454**: 961-967.
- Shao D and Lazar MA. (1997) Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem.***272**: 21473-21478.
- Siersbaek R, Nielsen R, John S, Sung MH, Baek S, Loft A, Hager GL and Mandrup S. (2011) Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor 'hotspots' during early adipogenesis. *EMBO J.***30**: 1459-1472.
- Siersbaek R, Nielsen R and Mandrup S. (2012) Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.***23**: 56-64.
- Silva JE and Rabelo R. (1997) Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol.***136**: 251-264.

- Smith RE and Hock RJ. (1963) Brown fat: thermogenic effector of arousal in hibernators. *Science*.**140**: 199-200.
- Smith RE and Horwitz BA. (1969) Brown fat and thermogenesis. *Physiol Rev*.**49**: 330-425.
- Stock MJ. (1989) The role of brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Proc Nutr Soc*.**48**: 189-196.
- Suter ER. (1969) The fine structure of brown adipose tissue. I. Cold-induced changes in the rat. *J Ultrastruct Res*.**26**: 216-241.
- Symonds ME, Mostyn A, Pearce S, Budge H and Stephenson T. (2003) Endocrine and nutritional regulation of fetal adipose tissue development. *J Endocrinol*.**179**: 293-299.
- Tao H and Umek RM. (2000) C/EBPalpha is required to maintain postmitotic growth arrest in adipocytes. *DNA Cell Biol*.**19**: 9-18.
- Tienrungroj W, Sanchez ER, Housley PR, Harrison RW and Pratt WB.(1987) Glucocorticoid receptor phosphorylation, transformation, and DNA binding. *J Biol Chem*.**262**: 17342-17349.
- Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J and Cannon B. (2007) Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*.**104**: 4401-4406.
- Tran KV, Gealekman O, Frontini A, Zingaretti MC, Morroni M, Giordano A, Smorlesi A, Perugini J, De Matteis R, Sbarbati A, Corvera S and Cinti S. (2012) The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab*.**15**: 222-229.
- Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, Tran TT, Suzuki R, Espinoza DO, Yamamoto Y, Ahrens MJ, Dudley AT, Norris AW, Kulkarni RN and Kahn CR. (2008) New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*.**454**: 1000-1004.
- Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P and Spiegelman BM. (2006) Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis

and brown fat differentiation. *Cell Metab.***3**: 333-341.

- Varzaneh FE, Shillabeer G, Wong KL and Lau DC. (1994) Extracellular matrix components secreted by microvascular endothelial cells stimulate preadipocyte differentiation in vitro. *Metabolism.***43**: 906-912.
- Vercauteren K, Pasko RA, Gleyzer N, Marino VM and Scarpulla RC. (2006) PGC-1-related coactivator: immediate early expression and characterization of a CREB/NRF-1 binding domain associated with cytochrome c promoter occupancy and respiratory growth. *Mol Cell Biol.***26**: 7409-7419.
- Villena JA, Carmona MC, Rodriguez de la Concepcion M, Rossmesl M, Vinas O, Mampel T, Iglesias R, Giralt M and Villarroya F. (2002) Mitochondrial biogenesis in brown adipose tissue is associated with differential expression of transcription regulatory factors. *Cell Mol Life Sci.***59**: 1934-1944.
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S and Nuutila P. (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.***360**: 1518-1525.
- Vucetic M, Otasevic V, Korac A, Stancic A, Jankovic A, Markelic M, Golic I, Velickovic K, Buzadzic B and Korac B. (2011) Interscapular brown adipose tissue metabolic reprogramming during cold acclimation: Interplay of HIF-1alpha and AMPKalpha. *Biochim Biophys Acta.***1810**: 1252-1261.
- Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR and Darlington GJ. (1995) Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science.***269**: 1108-1112.
- Wang YX. (2010) PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res.***20**: 124-137.
- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ and Spiegelman BM. (1999) Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell.***3**: 151-158.
- Xia Y, Buja LM, Scarpulla RC and McMillin JB. (1997) Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.***94**: 11399-11404.

- Yamamoto K, Sakaguchi M, Medina RJ, Niida A, Sakaguchi Y, Miyazaki M, Kataoka K and Huh NH. (2010) Transcriptional regulation of a brown adipocyte-specific gene, UCP1, by KLF11 and KLF15. *Biochem Biophys Res Commun.* **400**: 175-180.
- Zamani N and Brown CW. (2011) Emerging roles for the transforming growth factor- β superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocr Rev.* **32**: 387-403.
- Zancanaro C, Carnielli VP, Moretti C, Benati D and Gamba P. (1995) An ultrastructural study of brown adipose tissue in pre-term human newborns. *Tissue Cell.* **27**: 339-348.
- Zhao J, Cannon B and Nedergaard J. (1998) Thermogenesis is β 3- but not β 1-adrenergically mediated in rat brown fat cells, even after cold acclimation. *Am J Physiol.* **275**: R2002-2011.
- Zinchuk V and Zinchuk O. (2008) Quantitative colocalization analysis of confocal fluorescence microscopy images. *Curr Protoc Cell Biol.* **Chapter 4**: Unit 4 19.

PRILOG - SPISAK SKRAĆENICA

BAT	engl. <i>brown adipose tissue</i> – mrko masno tkivo
WAT	engl. <i>white adipose tissue</i> , belo masno tkivo
UCP1	engl. <i>uncoupling protein 1</i> , dekuplujući protein 1
ATP	adenozin-trifosfat
cAMP	ciklični adenzin-monofosfat
PPARγ	engl. <i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PGC-1α	engl. <i>PPARγ coactivator-1α</i>
C/EBP	engl. <i>CCAAT/enhancer-binding protein a</i>
KLF	engl. <i>Krüppel-like factor</i>
mtDNK	mitohondrijalna dezoksiribonukleinska kiselina
NRF1	engl. <i>nuclear respiratory factor</i>
Mfn2	mitofuzin
Drp1	engl. <i>dinamin-related protein 1</i>
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
TGF-β	engl. <i>transforming growth factor-β</i> - faktor transformacije rasta β
BMP	engl. <i>bone morphogenic proteins</i>
FABP4	engl. <i>fatty acid binding protein 4</i>
Myf5	engl. <i>myogenic regulatory factor 5</i>
PRDM16	engl. <i>PRD1-BF1-RIZ1 homologous domain-containing 16</i>
MSC	mezenhimska stem ćelija
fBAT	engl. <i>fetal brown adipose tissue</i> - fetalno mrko masno tkivo
ERα	estrogenski receptor alfa
ERβ	estrogenski receptor beta

BIOGRAFIJA AUTORA

Ksenija Veličković (rođena Mićunović) rođena je 27. novembra 1977. godine u Zemunu, Republika Srbija. Diplomirala je na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, jula 2004. godine, sa prosečnom ocenom u toku studija 8.24. Iste godine, upisuje magistarske studije iz Citologije, a 2006. godine doktorske studije, modul Biologija ćelija i tkiva, na matičnom fakultetu, pod mentorstvom prof. dr Aleksandre Korać. Od decembra 2007. godine zaposlena je kao asistent na Biološkom fakultetu. Pored nastavne aktivnosti, od 2007. godine učestvovala je u naučnom radu na projektu 143050 Ministarstva nauke Republike Srbije (Biološki fakultet, Institut za zoologiju, Katedra za biologiju ćelija i tkiva), a potom na projektima 173054 i 173055 Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije (Biološki fakultet, Institut za zoologiju, Katedra za biologiju ćelija i tkiva). Od 2007. godine član je Srpskog i Evropskog društva za mikroskopiju, a od 2008. godine i Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju.

Autor je: 5 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 1 rada u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), 4 rada u međunarodnim časopisima (M23), 19 saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34) i 13 saopštenja sa nacionalnih naučnih skupova štampanih u izvodu (M64).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ксенија Д. Величковић

број уписа БО 060024

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Транскрипциона регулација развоја и хиперплазије мрког масног ткива“.

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 01.06.2012.

Ксенија Величковић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Ксенија Д. Величковић

Број уписа: БО 060024

Студијски програм Биологија ћелија и ткива

Наслов рада: „Транскрипциона регулација развоја и хиперплазије мрког масног ткива“.

Ментори: Др Александра Кораћ, редовни професор

Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Др Александра Чворо, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду и истраживач The Methodist Hospital Research Institute Department of Genomic Medicine, Houston, Texas, USA,

Потписани _ Ксенија Д. Величковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 01.06.2012.

Ксенија Величковић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Транскрипциона регулација развоја и хиперплазије мрког масног ткива“.

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 01.06.2012

Ксенија Величковић